

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación



**DESARROLLO DE NUEVOS INGREDIENTES
BIOACTIVOS PROCEDENTES DE UVAS**

M^a MERCÈ MERCADER MARTÍ

TESIS DOCTORAL

2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación



DESARROLLO DE NUEVOS INGREDIENTES BIOACTIVOS PROCEDENTES DE UVAS

Memoria presentada por:

M^a MERCÈ MERCADER MARTÍ

Para optar al grado de

Doctor en Biología y Ciencias de la Alimentación

Trabajo realizado bajo la dirección de

Dra. Laura Jaime de Pablo

**DÑA. LAURA JAIME DE PABLO, PROFESORA TITULAR DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.**

CERTIFICA,

Que el presente trabajo titulado **“Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos procedentes de uvas”**, y que constituye la memoria que presenta Doña Mercè Mercader Martí para optar al grado de Doctor en Biología y Ciencias de la Alimentación, ha sido realizado bajo su dirección en la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firma el presente informe en Madrid a 8 de mayo de 2017.

Fdo. Dra Laura Jaime de Pablo

Profesora Titular de Universidad

Área de Tecnología de Alimentos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Guillermo Reglero Rada, jefe del Grupo de Investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales (INGREEN) de la Universidad Autónoma de Madrid y Director del proyecto donde se inscribe esta Tesis Doctoral por darme la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora. Asimismo, gracias por atención, amabilidad y disponibilidad durante estos años.

Quisiera agradecer a la Universidad Autónoma de Madrid, a la Facultad de Ciencias y, en especial, a la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su tutela.

A mi directora, la Dra. Laura Jaime de Pablo, debo agradecerle su exigencia, paciencia y determinación con las que ha ido conduciendo este trabajo.

A la bodega Miguel Torres, y sobre todo a Mireia Torres Maczassek, doy las gracias por ofrecerme esta formación y facilitar todos los medios para alcanzarla.

Me gustaría agradecer a mi familia: Ezequiel y mis hijos (Fèlix, Núria y Josep) con los que he disfrutado y sufrido la evolución de la tesis. Solo ellos conocen el esfuerzo personal, y me alegro poder responder, después de oír mil veces,...Mama, ¿cuándo vas a terminar para poder hacer otras actividades?

Finalmente doy las gracias a mi padre, que siempre ha creído en mí y que no podrá oírlo, y a mi madre, que siempre está ahí para ayudarme.

Mi propósito ha sido servir a Miguel Torres, a la Universidad Autónoma de Madrid y a cuantos quieran aumentar los talentos recibidos.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| Lista de abreviaturas | 1 |
| Resumen | 3 |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos. Antecedentes y estado actual. | 7 |
| 1.2. El estatus antioxidante | 9 |
| 1.2.1. Fuentes naturales de compuestos antioxidantes | 14 |
| 1.3 Los compuestos fenolicos | 16 |
| 1.3.1. Clasificación | 16 |
| 1.3.2. Biosíntesis | 27 |
| 1.3.3. Métodos de análisis | 29 |
| 1.3.4. Efectos beneficiosos sobre la salud | 32 |
| 1.4. La uva como fuente de compuestos fenolicos bioactivos | 35 |
| 1.4.1. Morfología del grano de uva | 35 |
| 1.4.2. Los compuestos fenolicos de la uva | 37 |
| 1.4.3. Actividades biológicas asociadas a los compuestos fenolicos de la uva | 40 |
| 1.4.4. Estudios de biodisponibilidad | 42 |
| 1.4.5. Estudios <i>in vivo</i> | 44 |
| 2. Objetivos y plan de trabajo | 53 |
| 2.1 Objetivos | 55 |
| 2.2 Plan de trabajo | 57 |
| 3. Materiales y metodos | 59 |
| 3.1 Extractos de uva | 61 |
| 3.1.1. Obtención de extractos | 61 |
| 3.1.2. Determinación de la actividad antioxidante. | 65 |
| 3.1.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria | 67 |
| 3.1.4. Determinación de la composición fenolica | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Estudio de biodisponibilidad <i>in vitro</i> | 75 |
| 3.2.1. Simulación del proceso digestivo | 75 |
| 3.2.2. Simulación de la absorción a través del epitelio intestinal | 75 |
| 3.3. Estudio en animales | 77 |
| 3.3.1. Diseño del estudio | 77 |
| 3.4. Estudio toxicológico | 80 |
| 3.4.1. Diseño del estudio | 80 |
| 3.4.2. Parámetros analizados | 81 |
| 3.4.3. Interpretación de los resultados | 81 |
| 3.5. Estudio clínico | 82 |
| 3.5.1. Diseño del estudio | 82 |
| 3.5.2. Parámetros analizados | 89 |
| 3.6. Análisis estadístico | 97 |
| 3.6.1. Extractos de uva: actividad y composición | 97 |
| 3.6.2. Estudio con animales | 97 |
| 3.6.3. Estudio Toxicológico | 97 |
| 3.6.4. Estudio clínico | 98 |
| 4. Resultados y discusión | 99 |
| 4.1. Evaluación y caracterización de los compuestos antioxidantes procedentes de variedades de uva. | 101 |
| 4.1.1. Uvas blancas | 102 |
| 4.1.2. Uvas tintas | 134 |
| 4.2. Evaluación de la actividad funcional <i>in vivo</i> de extractos de uva | 161 |
| 4.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos | 161 |
| 4.2.2. Estudios celulares | 162 |
| 4.2.3. Estudio con animales | 170 |

| | |
|------------------------|------------|
| 4.2.4. Estudio clínico | 192 |
| 5. Conclusiones | 205 |
| 6. Bibliografía | 209 |
| 7. Anexo | 241 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------------------|--|
| ACP | Análisis de componentes principales |
| ABTS | Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) |
| Caco-2 | Línea celular de adenocarcinoma de colon |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidracilo |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo inmunoenzimático |
| ESI | Ionizador por electrospray |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HPLC-RP-DAD | Cromatografía de líquidos (fase reversa) con detector de haz de fotodiodos |
| IL | Interleuquina |
| IPC | Índice de Polifenoles totales |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LDLox | Lipoproteínas de baja densidad oxidadas |
| MDA | Malonaldehído |
| MLR | Regresión lineal múltiple |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio |
| NF-κB | Factor de transcripción nuclear κ B |
| PMA | 12-miristato, 13-acetato de forbol |
| PGE | Prostaglandina E |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| TBARS | Sustancias reactivas al ácido barbitúrico |
| TEAC | Actividad antioxidante en equivalentes de trolox |
| TEER | Potencial transmembrana |

| | |
|--------------------------------|---|
| THP-1 | Línea celular de monocitos de leucemia mieloide aguda |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral α |
| TPC | Contenido total en compuestos fenólicos |
| UPLC | Ultra cromatografía de líquidos |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión vascular |

Resumen

En la actualidad las sociedades industrializadas demandan, cada vez más, alimentos que proporcionen beneficios para la salud. En este sentido, la formulación de alimentos saludables se encuentra dirigida a la incorporación a través de la dieta de ciertos alimentos que compensen el desequilibrio alimentario imperante, o que contribuyan a mejorar algún aspecto concreto de la salud humana. En este sentido, las enfermedades cardiovasculares se sitúan a la cabeza de las principales causas de mortalidad en estas sociedades. De esta manera, numerosos estudios han puesto de manifiesto un posible efecto beneficioso cardioprotector asociado al consumo de diversas fuentes vegetales, como frutas y verduras, dentro de las cuales se encuentran la uva y sus respectivos derivados. Este efecto estaría relacionado con la actividad antioxidante y antiinflamatoria, entre otras, ejercida por los compuestos fenólicos que las mismas presentan.

Respecto a los posibles efectos beneficiosos de la uva y sus derivados, hasta la fecha, son escasos los estudios centrados en el análisis de la influencia de la variedad de uva en las características antioxidantes de los productos derivados de ella. Asimismo, la mayoría de los estudios realizados a partir de matrices vínicas se han llevado a cabo en condiciones *in vitro*, y, además, los estudios *in vivo* realizados han obtenido resultados controvertidos, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios *in vivo* con biomarcadores relacionados con el riesgo cardiovascular.

De esta manera, el objetivo principal de la presente memoria fue el estudio de la uva como fuente de compuestos fenólicos antioxidantes de cara al desarrollo de vinos, bebidas o nuevos ingredientes con propiedades cardiosaludables para el organismo humano.

Para conseguir dicho objetivo se llevó a cabo el estudio de la actividad antioxidante, por dos métodos distintos, índice de polifenoles totales (IPT) y composición fenólica individual de dos tipos de extractos (obtenidos con o sin la presencia de etanol en el medio de extracción) a partir de 46 variedades de uva, 20 blancas y 26 tintas, algunas de ellas ancestrales. Los resultados obtenidos mostraron el alto potencial de ciertas variedades de uva blanca (Roussanne, Riesling, Gewürstraminer, Viognier y Albariño) y tinta (Alicante bouchet, Petit verdot, las

vaariedades ancestrales 30, 32 y 8 junto con Merlot) como fuente de compuestos fenólicos antioxidantes, y especialmente el hollejo de dichas uvas.

A partir de los resultados obtenidos se formularon distintos extractos a partir de hollejos de uva de las variedades que presentaron los resultados más interesantes. Como paso previo a los estudios *in vivo* se llevó a cabo la caracterización funcional de los extractos obtenidos (antioxidante, antiinflamatoria, bioaccesibilidad, biodisponibilidad y toxicidad). Algunos de estos extractos mostraron una alta biodisponibilidad lo que los hace interesantes para la formulación de bebidas con efecto cardioprotector.

Respecto a los estudios *in vivo*, el estudio llevado a cabo en ratas Wistar macho adulto mostró un potencial efecto protector cardiovascular del extracto obtenido a partir de hollejos de uva utilizado frente al daño metabólico asociado a una dieta rica en colesterol y azúcares libres. Asimismo, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los beneficios de los productos analizados podrían ser potencialmente mayores en situaciones de estrés fisiológico. Por otro lado, en relación con el estudio clínico, el extracto utilizado mostró un posible efecto beneficioso cardiovascular a largo plazo, asociado con el aumento en la capacidad antioxidante plasmática observado. Sin embargo, para corroborar dicha hipótesis sería necesario un estudio de intervención de mayor duración.

De esta manera, los resultados obtenidos en la presente memoria ponen de manifiesto la posible utilización de la uva, y especialmente de su hollejo, como fuente de compuestos fenólicos con actividad beneficiosa cardiovascular, con los que poder diseñar nuevos ingredientes bioactivos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos. Antecedentes y estado actual.

En las últimas décadas se han producido numerosos hallazgos científicos que han puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre la alimentación y la salud. De esta manera, el consumo de ciertos alimentos se ha relacionado con diversas enfermedades y trastornos, como enfermedades cardiovasculares (Reddi y col., 2011; EFSA, 2011; Labuschagne y col., 2013; Martorell y col., 2016) enfermedades degenerativas, e incluso ciertos tipos de cáncer, entre otros. Estas evidencias científicas han confirmado la presencia en muchos alimentos de ciertos componentes con efectos beneficiosos para la salud, tales como derivados de proteínas, oligosacáridos, lípidos, compuestos fenólicos, etc. (OMS, 2012; Bravo y col., 1998)

Debido a ello en las sociedades industrializadas, se demandan cada vez más alimentos que proporcionen beneficios para la salud. Estos alimentos pueden ser tanto tradicionales como de nueva formulación. Sin embargo, hay que destacar que los alimentos tradicionales sólo pueden ejercer su función beneficiosa como parte de una dieta variada y equilibrada, que es difícil de conseguir en el contexto actual de hábitos de consumo poco saludables y de estilo de vida asociado al sedentarismo y alta actividad laboral. De esta manera, la formulación de alimentos saludables se encuentra enfocada a la incorporación en la dieta de ciertos alimentos que compensen el desequilibrio alimentario, o que contribuyan a mejorar algún aspecto concreto de la salud humana. Asimismo, no se debe olvidar que la respuesta a una misma dieta no es homogénea para todos los individuos, sino que existen importantes diferencias inter-individuales en función de la genética de cada persona. La comprensión de los mecanismos de interacción entre la dieta y la salud suscitan, por tanto, un alto interés por parte del consumidor, la industria alimentaria y el mundo científico, donde este último se debe de encargar de aportar las evidencias científicas sobre la ventajas del consumo de este tipo de alimentos.

El concepto de alimento funcional surgió en Japón en la década de los 80 con el objetivo de mejorar el estado de salud de una población cada vez más envejecida y en medio de una contracción de la economía nipona, por lo que el gobierno japonés propulsó el desarrollo de este tipo de alimentos con el fin de disminuir el gasto sanitario. De esta manera, en 1990 el Ministerio japonés de salud y bienestar emitió el primer decreto a nivel mundial que regulaba la comercialización de los “alimentos

de uso específico para la salud” (*Food for Specified Health Use*, FOSHU), que entró en vigor al año siguiente.

Por su parte, el *Codex Alimentarius* adoptó directrices generales sobre declaraciones de propiedades saludables en 1991 y directrices para el uso de declaraciones nutricionales en 1997; estas últimas fueron revisadas en 2004 y enmendadas por última vez en 2011 (Codex Alimentarius, 2013).

En vista del interés suscitado entre la población europea respecto a este tipo de alimentos, la Unión Europea creó una comisión de acción concertada sobre la ciencia de los alimentos funcionales en Europa (*Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe*, FUFOSE) coordinada por el *International Life Science Institute* (ILSI), que elaboró en 1999 un documento de consenso sobre estudios científicos relativos a los alimentos con propiedades saludables en Europa.

De esta acción concertada surgió la primera definición de alimento funcional aceptada en Europa con carácter general, definiéndolo de la siguiente manera: un alimento puede ser considerado funcional si se puede demostrar satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa a una o más funciones en el organismo, más allá de los efectos nutricionales, de modo que mejore el estado de salud y bienestar y/o reduzca el riesgo a padecer alguna enfermedad (Diplock y col., 1999). Un alimento funcional debe permanecer como alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades que puedan ser obtenidas dentro de una dieta normal: no es una píldora ni una cápsula. En contraposición, la comisión definió el término nutracéutico como: cualquier producto derivado de los alimentos que se comercialice en forma de polvos, píldoras y otras formas médicas que no son generalmente asociadas a un alimento y que demuestren poseer beneficios médicos y/o sanitarios, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. De esta manera este tipo de productos corresponden, desde un punto de vista legislativo, a un complemento alimenticio.

En la actualidad, el Reglamento Europeo (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, con entrada en vigor el 1 de julio de 2007, constituye el marco legislativo de cara a la publicidad y etiquetado de los alimentos con propiedades saludables, tanto tradicionales como de nueva formulación. Dicho reglamento establece que las declaraciones de propiedades saludables usadas en la

promoción de los alimentos se deben basar en evidencias científicas contrastadas y reales. Además, tiene en consideración las conclusiones recogidas en el proyecto FUFOS. En el Reglamento se reconoce a la *European Food and Safety Authority* (EFSA) como el organismo de evaluación de las bases científicas sobre las que se pretendan sustentar las declaraciones. Este organismo debe trabajar en coordinación con los organismos homólogos de los países miembros, que en el caso de España es la *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición* (AESAN).

Bien en forma de alimentos a los que se incorporan ingredientes bioactivos o en presentaciones típicas de los productos farmacéuticos, hoy en día, alrededor de la tercera parte del mercado alimentario de los países más desarrollados está constituido por alimentos con propiedades saludables (Reportlinker, 2012).

El diseño de este tipo de alimentos es una actividad multidisciplinar compleja, en la que se encuentran implicados multitud de procesos con el objetivo final de cumplir con la normativa que los regula. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

- Diseño de los procesos de obtención de los ingredientes bioactivos.
- Caracterización química de los mismos.
- Caracterización *in vitro* y en cultivos celulares de su actividad biológica.
- Biodisponibilidad del ingrediente sólo y en la matriz alimentaria en la que se pretenda formular.
- Diseño del alimento con propiedades saludables: aceptabilidad, calidad y seguridad.
- Estudios preclínicos en animales de experimentación.
- Estudios clínicos.

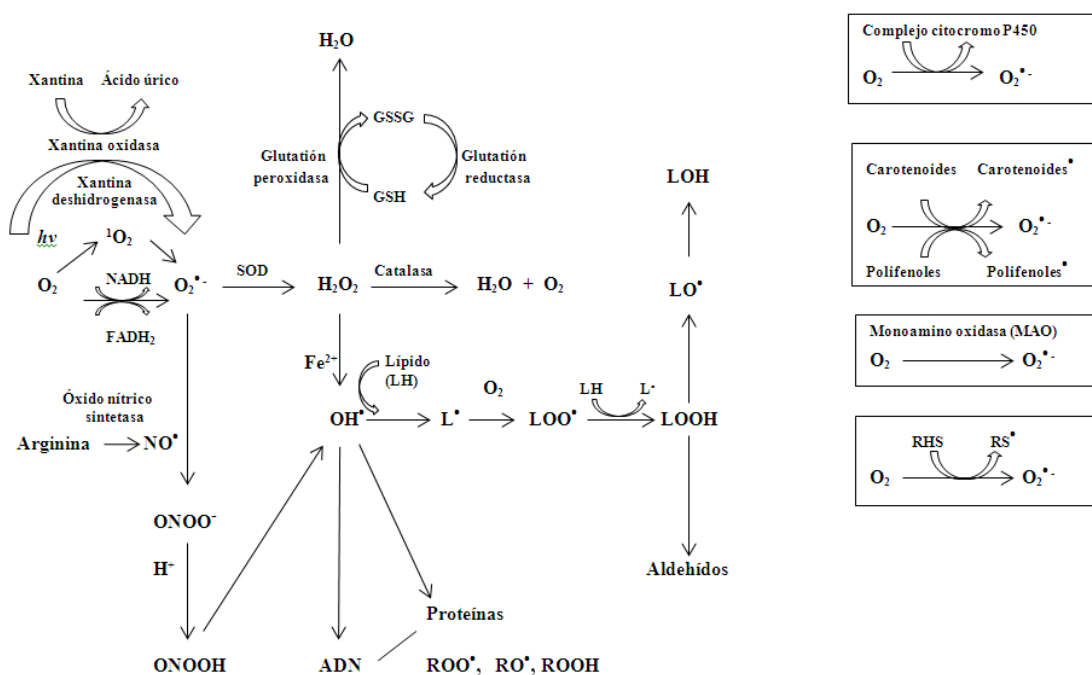
1.2. El estatus antioxidante

En los organismos vivos la presencia de ciertas especies reactivas, ya sean en forma de radical o no, pueden ocasionar daño oxidativo a nivel celular, lo que en última instancia podría estar relacionado con la aparición de ciertas patologías y enfermedades, como envejecimiento celular, diabetes, enfermedades degenerativas o cáncer, entre otras (Lu y col., 2004; Gupta y col., 2014). En los organismos vivos destacan por su abundancia las especies reactivas de oxígeno (ROS), junto con otras

menos abundantes como especies reactivas de nitrógeno (RNS), entre otras (RHS, RS, R) (Halliwell, 1999).

Un esquema simplificado de la formación de ROS, RNS, así como de su reacción con biomoléculas se muestra en la Figura 1.1. En ella se muestra cómo las ROS y RNS pueden reaccionar con distintas biomoléculas causando su modificación estructural y funcional. De esta manera favorecen las reacciones en cadena de radicales libres característica de la peroxidación lipídica, pueden causar mutaciones irreversibles de la molécula de ADN, así como la disfunción de enzimas por oxidación de proteínas. Estas reacciones con biomoléculas se producen, a veces, de forma selectiva y característica de las especies oxidantes implicadas.

Figura 1.1. Esquema simplificado de la formación de ROS, RNS y reacción con biomoléculas adaptado de Galisteo Ochaíta, 2008).



Con el fin de evitar el daño oxidativo causado por estas especies el organismo tiene habilitados toda una serie de mecanismos de defensa que producen su transformación en especies inactivas. Sin embargo, cuando estos mecanismos fallan se produce una acumulación de las especies reactivas dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo. De esta manera, su estudio y el de las especies que lo producen, está permitiendo descubrir aquellos recursos, tanto endógenos como

exógenos, que utiliza el organismo para defenderse de la oxidación celular, el llamado sistema de defensa antioxidante (Diplock y col., 1998; Kohen y col., 2002).

En función de cuál sea su mecanismo de acción, los antioxidantes que forman parte de este sistema de defensa, pueden dividirse en varios grupos:

a) **Antioxidantes preventivos.** La función de estos antioxidantes es actuar en primera línea de defensa inhibiendo la formación de especies reactivas. Dentro de este grupo encontramos numerosas enzimas encargadas de la descomposición de hidroperóxidos no radicales y peróxido de hidrógeno (Figura 1.1) como catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. En este grupo también se encuentran aquellas moléculas capaces de secuestrar metales de transición, como hierro y cobre, por quelación como glutatión en su forma reducida (GSH) (Scholtz y col., 1997; Wefers y col., 1988), transferrina, lactoferrina o haptoglobina, entre otras y especies capaces de inhibir al radical superóxido (Ghezzi, 2005) como superóxido dismutasa (Aguirre y col., 2012).

b) **Antioxidantes secuestradores de radicales libres.** Estos antioxidantes actúan en segunda línea de defensa inhibiendo reacciones tipo Fenton por secuestro directo de radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, uniéndose al H_2O_2 y eliminando O_2 . Dentro de este grupo se puede distinguir entre antioxidantes hidrofílicos, como la vitamina C (Frei y col., 1989, Fischer-Nielsen y col., 1992), el ácido úrico, la melatonina y la bilirrubina, (Cuzzocrea y col., 2001; Horstman y col., 2002) así como los compuestos fenólicos (Becker, 1993; Kohen y col., 1988), entre otros, y antioxidantes lipofílicos, como la vitamina E (Burton y col., 1985; Traber, 1997), el ubiquinol o los carotenoides (Krinsky, 1989), entre otros.

c) **Enzimas reparadoras.** Son enzimas que reparan el daño producido y reconstituyen membranas (lipasas, proteasas, enzimas reparadoras de ADN, transferasas).

En este contexto la función de los antioxidantes *in vivo* depende de los siguientes factores:

- 1) Solubilidad y localización (Alfaras y col., 2011; Day y col., 2000).
- 2) Interacciones entre antioxidantes (Burton y col., 1990; Taguchi y col., 2011).

- 3) Formas químicas y análogas. La capacidad antioxidante de un compuesto puede variar en función de las condiciones que sea determinada, por lo cual es importante evaluar los factores que afectan a la medida (Andriambeloson y col., 1998; Mauray y col., 2009).
- 4) Concentración. Con relación al alcohol, su consumo moderado (20-30 g/día en hombres y 10-20 g/día en mujeres) preferiblemente en comidas reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en un 14-25% comparado con los abstemios. Sin embargo, cuando el consumo es mayor (más de 60 g/día de alcohol) aumenta el riesgo de padecer incidentes cerebrovasculares, debido al incremento de la presión sanguínea (Mukamal y col., 2010; Ronksley y col., 2011; Umoh y col., 2014).

El estudio de compuestos con potencial efecto antioxidante hace necesaria la existencia de métodos *in vitro* simples, rápidos y, sobre todo, fiables, para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos ya sea en su forma pura (moléculas aisladas) o compleja (alimentos o muestras biológicas) (Magalhaes y col., 2008). En este sentido, el uso de métodos de medida de la capacidad antioxidante *in vitro* se encuentra justificado en estudios enfocados en la búsqueda de los extractos o compuestos más activos dentro de una batería muy amplia de muestras; un compuesto con baja actividad antioxidante *in vitro* es poco probable que sea mucho mejor *in vivo* (Halliwell, 1994).

Existen una gran variedad de métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*, pero ninguno está oficialmente aprobado ni estandarizado. Por esta razón, los datos aportados por los diferentes investigadores son difíciles de comparar e interpretar, ya que el significado y la relevancia de los estudios realizados depende en gran medida del método de ensayo empleado (Frankel y col., 2000). Cada vez es más evidente que una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante requiere el uso de diferentes métodos de ensayo que incluyan y contemplen los múltiples factores y mecanismos que rodean la inhibición del proceso oxidativo (Schlesier y col., 2002; Dudonné, 2009). Y el empleo de un patrón de referencia, como es el Trolox (derivado sintético de la Vitamina E) facilita la comparación.

Asimismo, los métodos *in-vitro* se han desarrollado y evaluado en relación a datos *in-vivo* para asegurar un modelo predictivo adecuado. De esta manera, los métodos de determinación de la actividad antioxidante *in vitro* constituyen un modelo sencillo y económico de cara a la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes a partir de matrices vegetales. Sin embargo, tienen el inconveniente de que no reflejan las condiciones fisiológicas celulares. Por otro lado, los estudios con modelos animales y los ensayos clínicos con humanos son caros e implican cuestiones éticas, por lo que resultan poco adecuados para estudios iniciales de actividad antioxidante. De esta manera, un sistema intermedio sería el uso de métodos de aproximación *in vitro*, entre los que destacan el uso de modelos de cultivos celulares, como los modelos celulares Caco-2 y HepG2, entre otros (Liu y col., 2005).

Por tanto, los métodos *in-vivo* es el último paso para evidenciar la actividad antioxidante de un compuesto o mezcla en un organismo vivo superior debido a su complejidad, a su mayor coste, dificultad en la elección del organismo diana y a sus repercusiones éticas de dichos ensayos.

Siguiendo una secuencia lógica se utilizan animales (métodos pre-clínicos) como paso previo a los ensayos en seres humanos. El modelo animal más utilizado es el empleo de ratones o ratas debido a la facilidad de manipulación, bajo coste de mantenimiento y además a la posibilidad de trabajar con especies mutadas que presenten diversas patologías, lo que permite realizar estudios dirigidos a grupos sensibles (Mauray y col., 2009). También se realizan con ellos ensayos de dosis efectiva y estudios de efecto en órganos. En algunos casos, por ejemplo en el estudio de nutraceuticos, se emplean modelos animales más próximos genéticamente al hombre como: conejos, cerdos, o monos. Evidentemente, cuanto mayor sea el animal, más complejo y caro será la aplicación del método (Monagas y col., 2010).

Finalmente, en función de los resultados obtenidos, se lleva a cabo el ensayo en seres humanos para demostrar su efecto en el organismo (Almoosawi y col., 2010; Llorach y col., 2010; Shinohara y col., 2010).

En la Tabla 1.1. se muestran los biomarcadores más utilizados en los ensayos *in vivo* clasificados en función de la biomolécula diana para evaluar el daño oxidativo celular, puesto que en este contexto un antioxidante se define como

“cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana” (Halliwell, 2007).

Tabla 1.1. Biomarcadores producto de la reacción de biomoléculas con especies reactivas específicas (adaptado de EFSA, 2011).

| Biomolécula | Especies reactivas | Biomarcador de estrés oxidativo |
|-------------------|--|--|
| ADN | OH [•] | 8-hidroxi guanina, 2-hidroxi adenina, 5-hidroxi citosina, formiluracil y 5-hidroxiuracil, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG) Ensayo Comet |
| Lípidos celulares | OH [•] , ROO [•] | Malondialdehído (MDA) 4-hidroxinonenal (HNE) F _{2α} -isoprostanos LDLs oxidadas |
| Proteínas | RNS (ONOO ⁻ , NO ₂ [•] ...) | 3-nitrosina proteica Carbonilos proteicos |

1.2.1. Fuentes naturales de compuestos antioxidantes

En la naturaleza podemos encontrar diversas fuentes de compuestos antioxidantes que ingerimos a través de nuestra dieta: proteínas, lípidos, vitaminas (E, C o riboflavina), minerales (cobre, manganeso, cinc, selenio, hierro) y diversos fotoquímicos presentes en frutas y vegetales (Samoylenko y col., 2013). Por este motivo, llevar una dieta equilibrada y variada es de vital importancia para mantener el equilibrio redox del organismo. A modo de resumen en la Tabla 1.2 se muestran algunos de los principales compuestos con acción antioxidante y sus principales fuentes.

Tabla 1.2. Fuentes naturales de compuestos antioxidantes

| Compuesto antioxidante | Fuente natural | Referencias |
|-------------------------|--|--|
| Vitamina E | Hortalizas, verduras, frutos secos, aceites vegetales, cereales y mantequilla | National of Health Institute, 2016b |
| Vitamina C | Frutas, verduras y hortalizas | National of Health Institute, 2016a |
| Vitamina B2 | Peces, aves de corral, carne, huevos, productos lácteos. | Collins., 2015 |
| Compuestos fenólicos | Frutas, verduras y hortalizas | Manach y col., 2004; Jaeger y col., 2009 |
| Glutathión | Uva y vino | Fracasselti y col., 2011 |
| Cisteína y otros tioles | Uva, vino brócoli, repollo, coliflor. | Zott y col., 2011 |
| Melatonina | Alimentos fermentados con levaduras (vino tinto, cerveza y miga de pan) | Iriti y col., 2014; Kocadagli y col., 2014 |
| Coenzima Q10 | Carne, pescado y semillas de colza | Yubero-Serrano y col., 2014; Reig y col., 2015 |
| Coenzima Q9 | Cereales | Mattila y col., 2001 |
| Ácido lipóico | Carnes y vísceras, hortalizas y verduras | Higdon 2012; Durrani y col., 2015 |
| Proteínas (enzimas) | Carnes, leche, queso, pescado, huevos, frutos secos, frutas leguminosas, ajo, setas, mantequillas y algunas semillas | Collins., 2015; Gavin., 2011; Vorvick., 2014 |
| Cobre | Mariscos, granos enteros, vísceras, frutos secos, tubérculos, entre otros | Evert., 2013 |
| Manganeso | Verduras, cereales, frutos, leguminosas, entre otros | Gómez-Miguel y col., 2014 |
| Zinc | Mariscos, carnes rojas, aves, pescados, cereales integrales, entre otros | Evert., 2013 |
| Selenio | Mariscos, carne, huevos, lácteos, pan y cereales | Coates., 2014 |

La manipulación, el procesado y el almacenamiento de los alimentos pueden afectar el estado oxidativo de los mismos. Los productos de oxidación resultantes dependen de muchos factores (temperatura, luz y aire, cantidad y tipo de compuestos, presencia de metales, etc.) (Genova y col., 2012; Halliwell, 1995). También el procesado de los alimentos puede dar lugar al desarrollo de productos con capacidad antioxidante, como los resultantes de la reacción de Maillard, o prooxidantes (Gazzani y col., 1998; Wijngaard y col., 2009). Asimismo, el metabolismo de ciertos

componentes de los alimentos, como la hemoglobina y las purinas dan lugar, en el organismo, a compuestos con destacada actividad antioxidante, como la bilirrubina y el ácido úrico, respectivamente (Mittleman y otros., 2012; Collins., 2015; U.S.Department of Agriculture, 2010).

El aumento del interés de los consumidores por una alimentación saludable ha dirigido la atención de los productores a utilizar los subproductos del procesado como fuente de ingredientes bioactivos (Laufenberg y col., 2003; Jahan y col., 2006; Ugartondo y col., 2008). Para ello es necesario mejorar los procesos de extracción y demostrar la funcionalidad de los compuestos extraídos, conservando los requisitos de seguridad alimentaria (Hasler, 2000; Horax R y col., 2010; Ugartondo y col., 2007). En este sentido, las bodegas producen una gran cantidad de subproductos, principalmente raspones, hollejos y pepitas; de los cuales los hollejos suponen alrededor del 30% (p/p) de la uva vinificada. Según la bibliografía este subproducto podría constituir una buena fuente de compuestos antioxidantes con propiedades saludables (Monagas y col., 2003;Teixeira y col., 2014a).

Asimismo, muchos compuestos fenólicos contribuyen, además, a las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y, por tanto, tienen importancia en la calidad de los mismos (Tomás-Barberán y col., 2001). Por ejemplo, estas sustancias son responsables de la astringencia de determinados alimentos (Lesschaeve y col., 2005; Santos-Buelga y col., 2000).

1.3 Los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de sustancias que proceden del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos (Manach y col., 2004; Anastasiadi y col., 2010).

1.3.1. Clasificación

Se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos fenólicos con estructura muy variada. La clasificación más utilizada es aquella que los divide en dos grandes grupos en función de su estructura: flavonoides y no flavonoides. Los no flavonoides derivan del floroglucinol (Figura 1.2) y a este grupo pertenecen los ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos hidrolizables, entre otros. Dentro

de ellos, se distinguen dos clases de ácidos fenólicos: los derivados del ácido benzóico y los derivados del ácido cinámico.

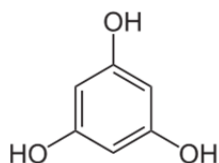


Figura 1.2 Estructura del floroglucinol (Arbenz y col., 2015).

La palabra flavonoide proviene del latín “flavus” que significa amarillo. Estos son responsables de los colores amarillo, marrón, rojo, naranja y azul típicos de las hojas otoñales o de algunas flores. Los flavonoides comparten una estructura común de 2 anillos aromáticos (A y B), enlazados por 3 átomos de carbono, que forman, por regla general, un heterociclo oxigenado (anillo C) (Figura 1.3).

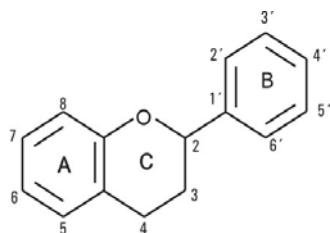


Figura 1.3. Estructura básica flavonoides (Spencer y col., 2001).

Esta familia, con cerca de 4.000 estructuras diferentes, es una de las más estudiadas, y está dividida en diferentes subclases, destacando por su abundancia los flavanoles, antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y taninos condensados (Manach y col., 2004).

Ambos anillos pueden encontrarse unidos a derivados funcionales como ésteres, metilésteres, glicosidados, etc., (Harborne, 1989) o a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos, así como a otros compuestos fenólicos (Bravo y col., 1998). Su solubilidad en agua difiere entre un tipo de compuestos y otros, así como a su presencia en forma esterificada con azúcares o ácidos orgánicos, aunque por término general son relativamente solubles en medios acuosos o hidroalcohólicos (Shahidi y col., 1995).

A) Compuestos fenólicos no flavonoideos

Ácidos hidroxibenzóicos

Los ácidos hidroxibenzóicos son las formas más simples de los compuestos fenólicos: formados por un anillo bencénico y una cadena lateral con un grupo carboxilo. Pueden presentar, además, grupos hidroxilo o metoxilo en las posiciones libres del anillo dando lugar a distintos ácidos hidroxibenzóicos (Figura 1.4).

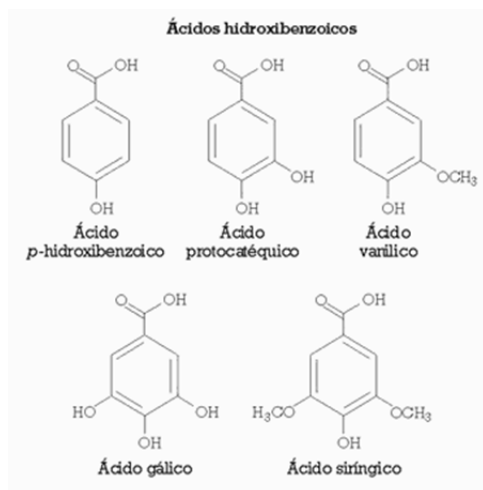


Figura 1.4. Estructura ácidos hidroxibenzóicos (Rodríguez y col., 2007).

Ácidos hidroxicinámicos

Se caracterizan por ser moléculas con un anillo bencénico unido a una cadena alifática de tres átomos de carbono. El doble enlace existente entre los carbonos 2 y 3 de la cadena alifática da lugar a la existencia de dos isómeros, cis y trans, dentro de una misma estructura química. Asimismo, la presencia de grupos hidroxilo o metoxilo presentes en las posiciones libres del anillo (excepto los ortos por impedimento estérico) da lugar a la formación de distintos ácidos hidroxicinámicos (Figura 1.5). Es habitual la unión de este tipo de estructuras, mediante enlace éster, con ácidos orgánicos, tales como el tartárico y el quínico.

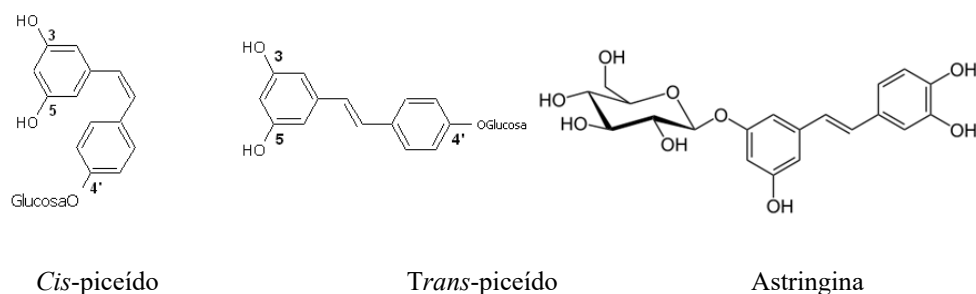


Figura 1.8. Estructura estilbenos glicosidados.

La forma *trans*- es mayoritaria, debido a que es la más estable, y puede transformarse en *cis*- por acción de la luz ultravioleta o un pH alto. La conversión de *cis*- a *trans*- se facilita por luz visible, alta temperatura o bajos pHs (Shakibaei y col., 2009).

La polimerización del resveratrol conduce a las viniferinas (Daniel y col., 1999) u hopeafenol (Figura 1.9), aunque hay otras como el miyabenol C, (trímero), o r-viniferina (Vitisina B) y r-2-viniferina (Vitisina A) (tetrámeros).

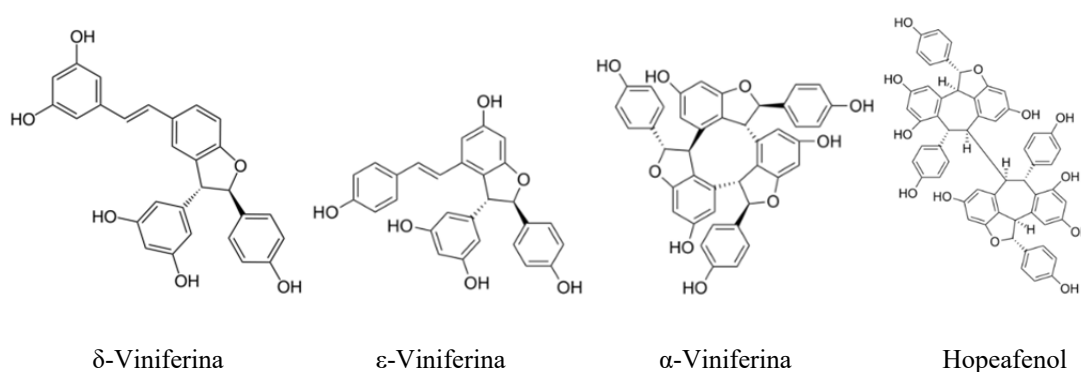


Figura 1.9. Estructuras polimerizadas de estilbenos (Chaher y col., 2014).

Lignanos

Los lignanos están formados por 2 unidades de fenilpropano que dan lugar a distintas estructuras químicas, tal y como se muestra en la Figura 1.10.

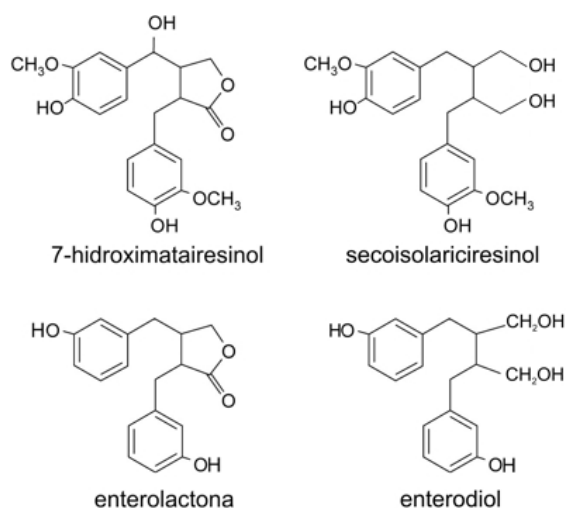


Figura 1.10. Estructura de los lignanos más abundantes.

Taninos hidrolizables

Se trata de polímeros heterogéneos formados por la unión de ácidos fenólicos, en particular ácido gálico y monosacáridos, habitualmente glucosa (Figura 1.11).

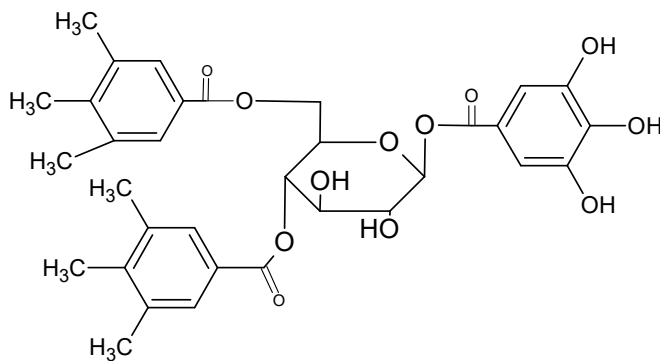


Figura 1.11. Estructura de un tanino hidrolizable

B) Compuestos fenólicos flavonoideos

Flavanoles

Los flavanoles presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 (Figura 1.12). Dentro de ellos los más abundantes son las catequinas, y sobre todo, la (+) catequina y la (-) epicatequina, que se pueden encontrar hasta en mil referencias (Pérez-Jiménez y col., 2010). Asimismo, la catequina y epicatequina pueden presentarse unidas a una molécula de ácido gálico dando lugar a galocatequina y epigalocatequina, respectivamente (Dreosti, 2000; Manach y col., 2004). A

diferencia de otras estructuras fenólicas, este tipo de estructuras no se encuentran glicosidadas en alimentos.

Por otro lado, los flavanoles pueden condensarse y dar lugar a los taninos condensados mediante enlace C_4-C_8 (el más común) o C_4-C_6 , formando dímeros, trímeros y oligómeros llamados proantocianidinas. Cuando el número de unidades básicas es elevado se habla polímeros de proantocianidinas o taninos condensados. Cuanto más polimerizada es la estructura, mayor es su carácter tánico y astringente (Manach y col., 2004). Dentro de ellos los más abundantes son las procianidinas (Figura 1.12).

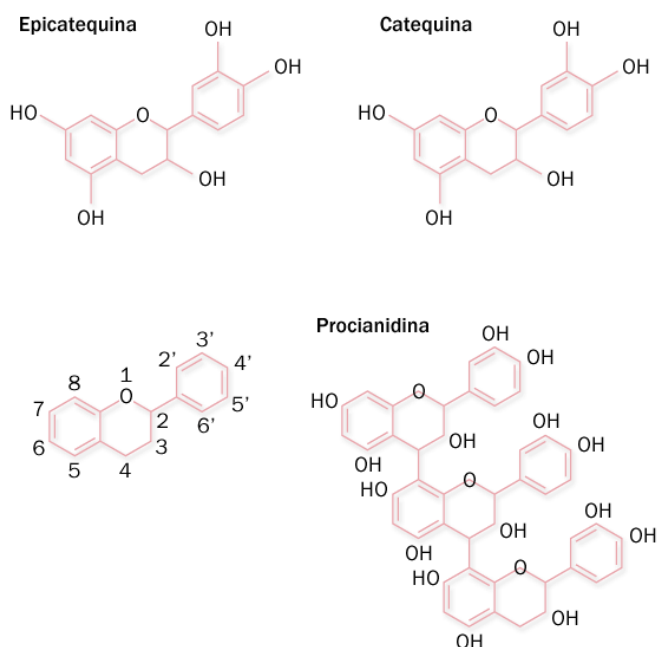


Figura 1.12. Estructura de los flavanoles más abundantes (Duarte Pérez y col., 2011).

Antocianos

Los antocianos presentan dos dobles enlaces entre la posición 3 y 4 y entre el oxígeno y la posición 2 del heterociclo (Figura 1.13), por lo que el oxígeno tiene una carga positiva deslocalizada en toda la molécula (catión flavilio), lo que le confiere el color rojo-azul característico de este tipo de compuestos.

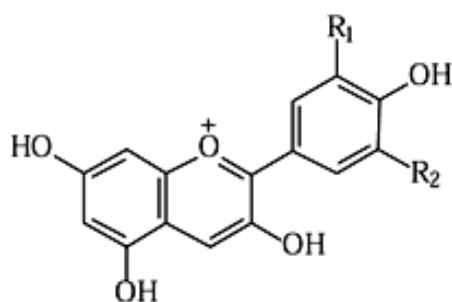


Figura 1.13. Estructura básica antocianidinas (González, 2011).

Dependiendo de los sustituyentes del anillo B se distinguen distintas estructuras (cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina).

El catión flavilio es predominante a pH <3 y tiene una coloración roja, mientras que a pHs más altos aparecen otras estructuras, no catiónicas, de color azul, incoloro o amarillo. Este tipo de compuestos son los pigmentos responsables de la llamativa coloración de las flores y los frutos de ciertos vegetales (Figura 1.14).

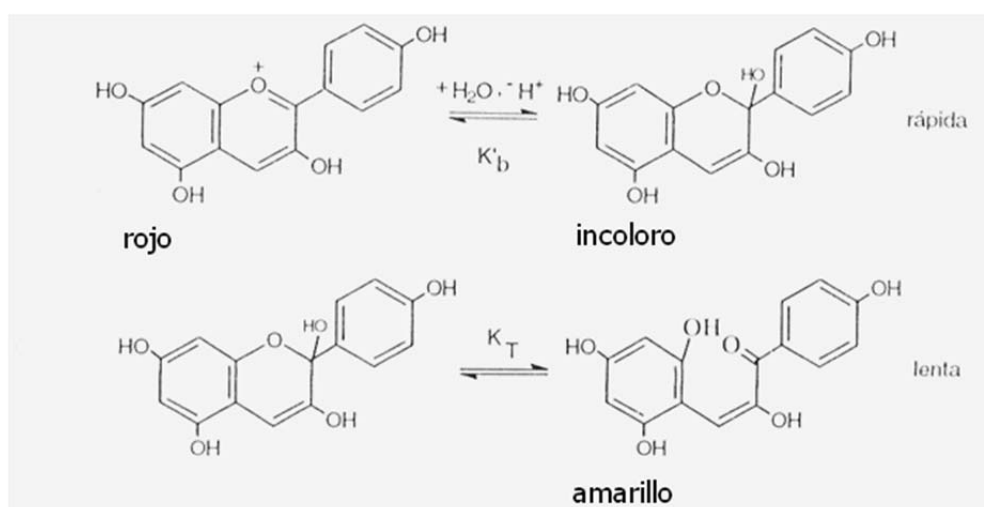


Figura 1.14. Estructuras de los antocianos según pH y coloraciones (González, 2011).

Los antocianos pueden estar glicosidados en diversos puntos, lo que tiene un efecto determinante sobre la estabilidad de la molécula (resistencia a la luz, pH y condiciones de oxidación) y sus capacidades colorantes. Se presentan también esterificadas con varios ácidos orgánicos, polimerizados o unidos a taninos, efecto llamado de copigmentación, ya que el enlace potencia la coloración (Cliff y col., 2007).

Flavonoles

Los flavonoles comparten la estructura general de 3-hidroxiflavona (Figura 1.15), en la que los distintos sustituyentes del anillo B da lugar a diferentes estructuras químicas.

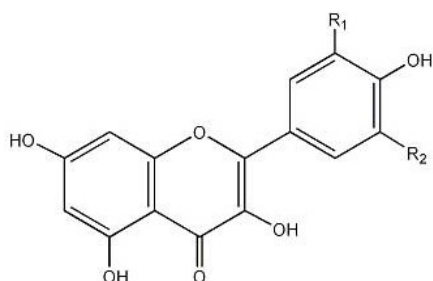


Figura 1.15. Estructura básica de los flavonoles (González, 2011).

Habitualmente se presentan en forma glicosidada y se acumulan en los tejidos exteriores aéreos (epidermis, hojas y piel de frutos), puesto que su síntesis está estimulada por la luz. Los principales representantes son la quercetina y el kaempferol.

Flavonas.

Las flavonas no son tan abundantes como los flavonoles en frutas y vegetales. Dentro de ellas las más representativas son los glucósidos de luteolina y apigenina (Figura 1.16). También pueden presentarse en forma polimetoxiladas (tangeretina, nobiletina y sinensetina entre otras), así como en la piel de los frutos cítricos.

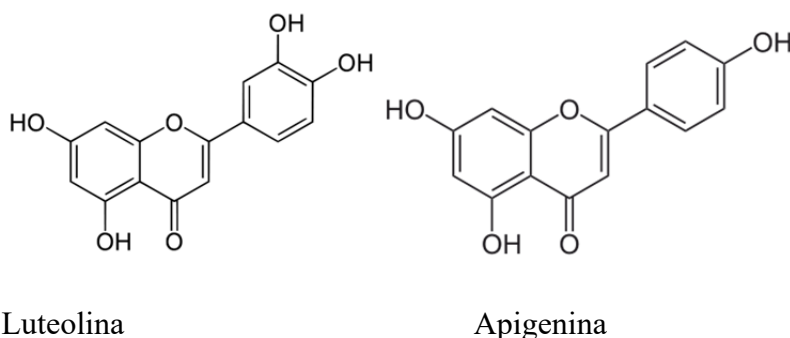


Figura 1.16. Estructura básica de las flavonas (Manach y col., 2004)

Flavanonas

Las flavanonas más importantes son la naringenina, la hesperetina y el eriodictiol (Figura 1.17). Aunque se presentan generalmente unidas a un disacárido en la posición 7: una neohesperidosa, como en naringina o neohesperidina (con sabor amargo), o una rutinosa como la narirutina, dando un compuesto sin sabor (Figura 1.18).

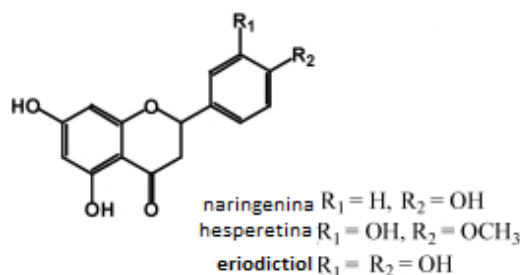


Figura 1.17. Estructura básica flavanonas (Manach y col., 2004)

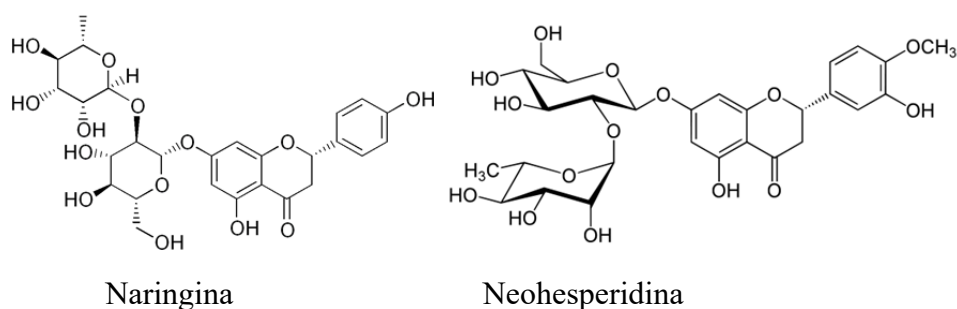


Figura 1.18. Estructura básica de la flavanonas unidas a un disacárido (Manach y col., 2004).

Isoflavonas

Las isoflavonas se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en la posición 7 y 4' con una configuración análoga, respecto a los grupos hidroxilos, al estradiol que le confiere propiedades pseudohormonales, incluida la de unirse a los receptores de estrógenos, por lo que se denominan fitoestrógenos. Las 3 moléculas principales son: genisteina, daidzeina y gliciteina (Figura 1.19). Habitualmente se presentan en forma glicosilada aunque son sensibles al calor, por lo que a menudo se separan del glucósido durante el tratamiento industrial como el calentamiento o la fermentación.

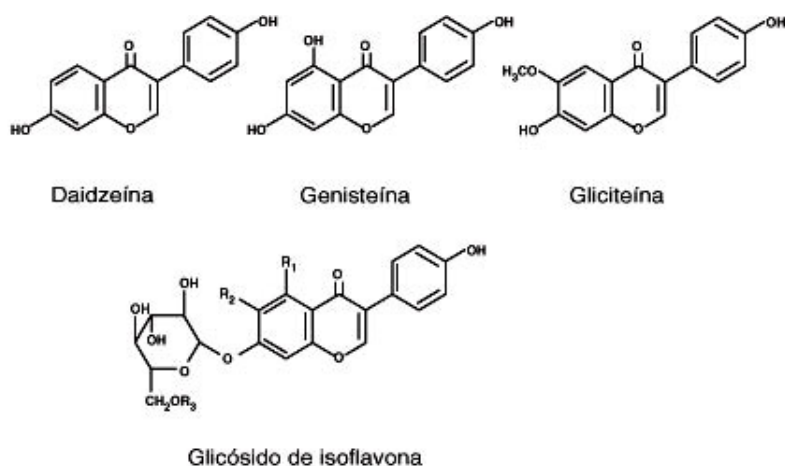


Figura 1.19. Estructura básica de las isoflavonas (Manach y col., 2004).

A modo de resumen en la Tabla 1.3 se muestran las fuentes naturales más abundantes de los compuestos fenólicos anteriormente mencionados.

Tabla 1.3. Fuentes naturales de compuestos fenólicos (CF)

| Familia de CF | Fuente Natural | Referencias |
|-------------------------|---|---|
| Flavanonas | Frutos cítricos, menta | Tomás-Barberán y col., 2000 |
| Flavan-3-oles | Frutos rojos, granada, nueces, uva, chocolate, té | Betés-Saura y col., 1996; Manach y col., 2004; Buendía y col., 2010 |
| Ácidos hidroxicinámicos | Café, té, uva, vino, arándano, kiwi, cereza | Manach y col., 2004 |
| Ácidos hidroxibenzóicos | Frutos rojos, rábano negro, cebollas y te | Manach y col., 2004 |
| Flavonoles | Aliáceas, crucíferas, tomate cherry, manzanas, uva tinta y té | Tomás-Barberán y col., 2001 |
| Flavonas | Perejil, apio y piel de los cítricos | Manach y col., 2004 |
| Antocianos | Frutos rojos, berenjena, cereza, ciruela, col roja y vino rojo | Manach y col., 2004 |
| Estilbenos | Uva, vino tinto, cacahuetes, pistacho y algunas bayas (grosella negra, arándanos, etc.) | Fernández-Mar y col., 2012 |
| Lignanos | Semillas de lino, lentejas, trigo, ajo, espárragos, zanahorias, peras y ciruelas | Manach y col., 2004 |
| Isoflavonas | Soja, leguminosas | Manach y col., 2004 |
| Alcoholes fenólicos | Aceite de oliva virgen, cereales, café | Pérez-Jiménez y col., 2010 |

1.3.2. Biosíntesis

Existen dos rutas biosintéticas principales para los compuestos fenólicos en plantas: la ruta del ácido shikímico y la de los fenilpropanoides (Randhir y col., 2004).

La vía del ácido shikímico tiene como punto de partida la conversión de los metabolitos primarios fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) en 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP) por la acción de la enzima DAHP sintasa (Figura 1.20). Esta ruta da lugar a la formación de los ácidos p-hidroxibenzóicos.

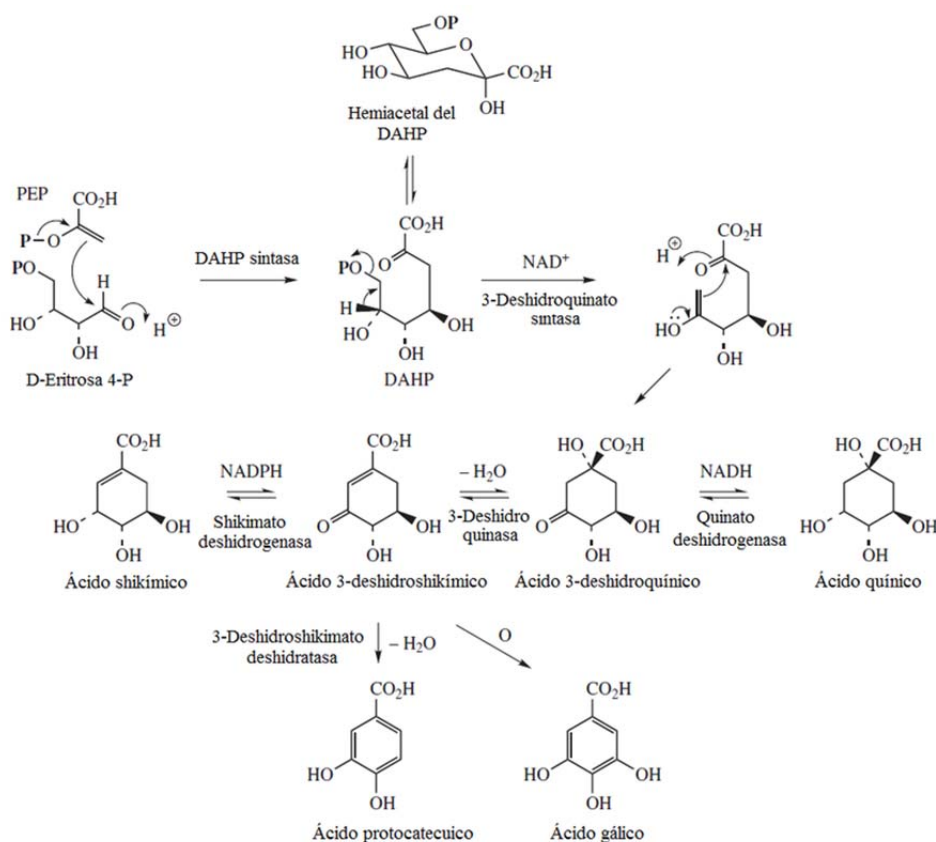


Figura 1.20. Ruta biosintética del ácido shikímico (Daniel y col., 1999).

Por su parte la biosíntesis de los ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos y flavonoides procede de la fenilalanina, mediante la ruta de los fenilpropanoides (Figura 1.21).

La biosíntesis de los derivados de las flavanonas (Figura 1.21) no está demostrada, pues los intermediarios no son biológicamente estables. De forma general, se podría decir que se produce una hidroxilación enzimática mediante la flavanona-3-

hidroxilasa para obtener el dihidroflavonol, el cual a través de la enzima dihidroflavonol reductasa daría el flavan-3,4-diol. Por su parte, mediante la acción de la antocianidina sintasa se obtendrían las antocianidinas, mientras que a través leucoantocianidina reductasa los flavan-3-oles.

Varios factores influyen en la biosíntesis de los compuestos fenólicos como: el estrés, las radiaciones UV, la existencia de altas temperaturas particularmente en zonas de clima mediterráneo, la baja disponibilidad de agua, o la protección de la planta frente al ataque de herbívoros (Hahlbrock y col., 1989; Parr y col., 2000); asimismo, respecto a los compuestos fenólicos la madurez, la variedad del fruto y el procedimiento de almacenamiento del mismo también ejercen una gran influencia (Cavaliere y col., 2010, Becatti y col., 2010).

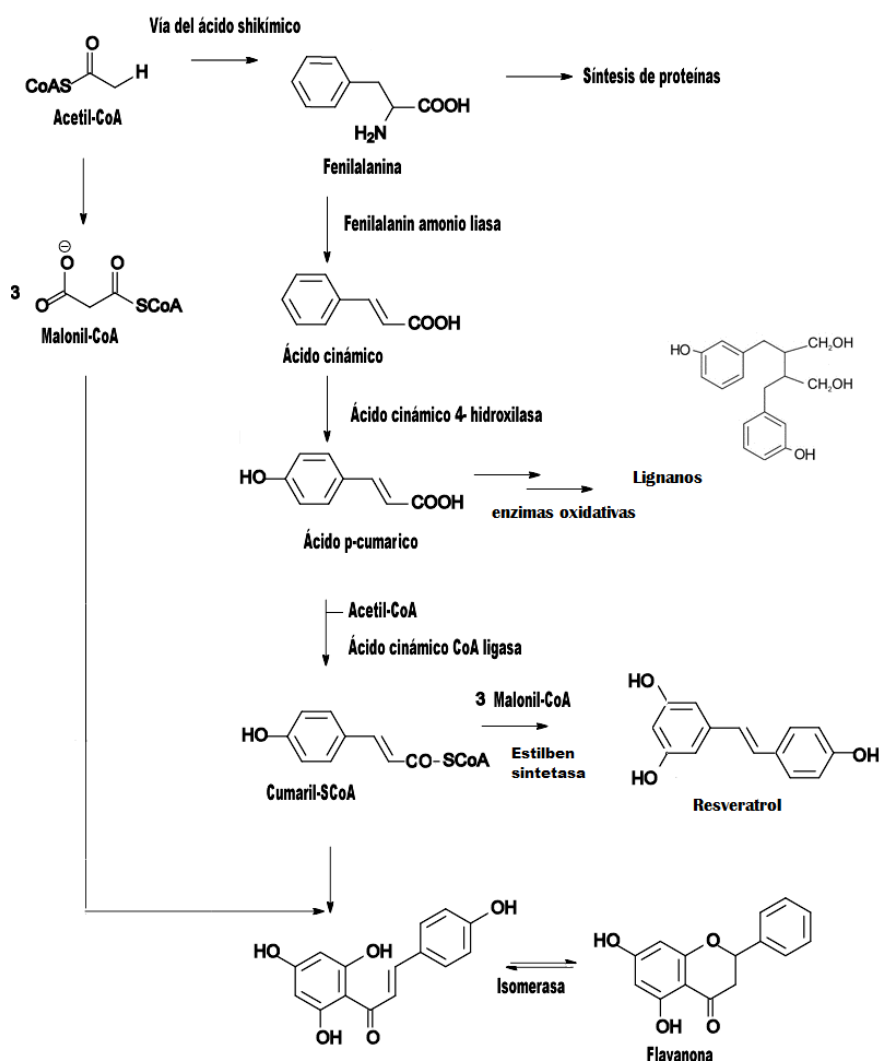


Figura 1.21. Ruta biosintética de los fenilpropanoides (Adaptado de Daniel y col., 1999).

1.3.3. Métodos de análisis

Los métodos de análisis están relacionados con las propiedades químicas de estos compuestos. Una de las principales características de la estructura química de los compuestos fenólicos es la existencia de anillos aromáticos (fenoles). Estos absorben en la zona del ultravioleta ($\lambda=280$ nm) y proporcionan fenómenos de resonancia. De esta manera, a partir de la absorción de la radiación a esta longitud de onda, se puede determinar el Índice de Fenoles Totales (IPT en sus siglas inglesas) (Ribéreau-Gayon, 1970). Un método alternativo para evaluar en su conjunto el contenido de compuestos fenólicos es que utiliza el reactivo de Folin Ciocalteu (Singleton y col., 1965), reconocido por la OIV (Organización Internacional del Vino) como método oficial de análisis (OIV, 2009), utiliza el reactivo de Folin Ciocalteu (Singleton y col., 1965). Sin embargo, este tipo de metodologías presentan la interferencia de numerosos compuestos (aminoácidos fenólicos, azúcares, etc.) por lo que sólo permiten conocer de manera aproximada el contenido en compuestos fenólicos de una determinada muestra. Dentro de ellos, en las bodegas se prefiere utilizar el IPT por su mayor simplicidad.

Por otro lado, las familias de compuestos fenólicos tienen estructuras químicas diferenciadas que dan lugar a distintos máximos de absorción, lo que permite su cuantificación a partir de un patrón de un compuesto puro a una concentración conocida. De esta manera, los ácidos hidroxycinámicos se pueden medir a una longitud de onda de 320 nm (expresados habitualmente como mg de ácido caféico/ L), los flavonoles a 360 nm (mg de quercetina/L) y los antocianos a 520 nm (mg de 3-glucósido de malvidina/L) (Cliff y col., 2007; Roussis y col., 2008).

Asimismo, existen diversos métodos espectrofotométricos que mediante el empleo de los reactivos de color específicos permite la determinación global de compuestos fenólicos específicos, como los taninos condensados, los flavonoides o los antocianos de manera directa o después de un proceso de fraccionamiento de la muestra (Cliff y col., 2007; Du Toit y col., 2012).

Sin embargo, para un análisis más pormenorizado de los compuestos fenólicos presentes en una determinada muestra la técnica más utilizada es el empleo de cromatografía de líquidos de alta eficacia, HPLC (High Performance Liquid

Chromatography) y de ultra eficacia o UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Las columnas cromatográficas más habituales están rellenas de un polímero C18 utilizándose, de manera general, una fase reversa de elución. De esta manera, los compuestos fenólicos son separados en función de su polaridad y afinidad a la fase estacionaria. Se pueden utilizar sistemas isocráticos, aunque el sistema de elución es normalmente binario, con un solvente acuoso acidificado (solvente A), para evitar la ionización de los ácidos fenólicos y así el desdoblamiento de picos, utilizando acético, perclórico, fosfórico, fórmico o trifluoroacético. El solvente B es un disolvente orgánico como el metanol o acetonitrilo, a veces acidificado con el mismo ácido del solvente acuoso. Los gradientes utilizados suelen comenzar con un gran porcentaje de la fase acuosa (generalmente 80–100%). En ciertas ocasiones también se han utilizado sistemas ternarios. Por otra parte, la utilización de un patrón interno resulta dificultosa, ya que los cromatogramas suelen salir muy poblados de picos. (Fang y col., 2007; Katalinic y col., 2010; Roggero y col., 1995).

El sistema de detección más habitual es mediante PAD (Photodiode Array Detector) y la máxima absorbancia a una determinada longitud de onda depende del número, posición y tipo de sustituyentes adicionales en el anillo. Por ejemplo, la sustitución orto– y meta– tiene por resultado un cambio batocrómico. Como se ha comentado anteriormente, los compuestos benzóicos, estilbenos y flavanoles presentan un máximo de absorción alrededor de 280 nm, los ácidos hidroxicinámicos a 320 nm, los flavonoles a 360 nm y los antocianos a 520 nm (Alén-Ruiz y col., 2009). Otro sistema alternativo de detección es el empleo de fluorescencia, exclusivo para moléculas fluorescentes sino se derivatizan. Este requiere poco tiempo de análisis, ya que varias moléculas pueden eluir juntas, pero solo se detectan las fluorescentes, por lo que es muy selectivo y permite cuantificar cantidades menores (Roggero y col., 1995). Se emplea para distinguir flavanoles galoilados y no galoilados. De esta manera, mediante el empleo combinado del tiempo de retención, espectro visible-ultravioleta y su comparación con compuestos puros es posible la identificación y cuantificación de numerosos compuestos fenólicos (Monagas y col., 2003).

En la medida que ha progresado la tecnología, se han incorporado los detectores por espectrometría de masas al análisis cromatográfico. Para las muestras

líquidas entre el cromatógrafo y detector de masas es necesario el empleo de un equipo de ionización. En la actualidad el más empleado es el ionizador por electrospray (ESI). Estos equipos bombardean las muestras gaseosas o vaporizadas con un haz de electrones, generando trozos de la molécula característicos, que permiten identificarla, siempre y cuando llegue pura. En el caso de mezclas se debe filtrar el cromatograma por un ión o producto de fragmentación correspondiente a un único compuesto. La aparición paulatina de publicaciones con espectros de masas de compuestos específicos ha permitido la estandarización de esta técnica en el análisis de compuestos fenólicos, aunque debido a la existencia de miles de estructuras fenólicas la información de espectros de masas actual todavía es muy limitada (Chamkha y col., 2003).

Otra técnica cromatográfica que permite la identificación de compuestos fenólicos individuales es la cromatografía en capa fina (TLC). Las principales ventajas de esta técnica son su sencillez y rapidez, permitiendo la separación de compuestos. Sin embargo, no permite la cuantificación de estos compuestos y para muestras complejas no permite una elución eficiente, haciéndose necesario el empleo de TLC en dos dimensiones (Betés-Saura y col., 1996; Landrault y col., 2001).

Aunque es poco común, se encuentran en la bibliografía métodos de separación por cromatografía de gases (GC) acoplado a un detector de masas (MS) después de derivatizar los compuestos fenólicos para que sean volátiles (Betés-Saura y col., 1996).

Sin embargo, la única técnica que permite la identificación inequívoca de los compuestos fenólicos es la resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, su empleo implica el aislamiento previo de compuestos puros en matrices complejas lo que limita el uso de esta técnica de manera rutinaria (Landrault y col., 2002).

Todos los métodos anteriormente descritos sólo admiten muestras líquidas y limpias, por lo que como mínimo es necesaria una filtración, por 0,45 o 0,22 μm , o bien una centrifugación exhaustiva. En el análisis de la composición fenólica de frutas, éstas se deben someter a prensado o trituración y filtración/centrifugación antes de su análisis (Betés-Saura y col., 1996), mientras que si se parte de muestras sólidas o granos, se requiere un proceso de extracción con mezclas hidroalcohólicas.

Por otra parte, algunas técnicas requieren purificación y concentración con extracciones en fase sólida o derivatización de algunos compuestos (Betés-Saura y col., 1996; Chamkha y col., 2003). Por último, hay que tener en cuenta que todas las etapas de acondicionamiento de la muestra pueden influir en el resultado de la cuantificación.

1.3.4. Efectos beneficiosos sobre la salud

El primer interés en los compuestos fenólicos respecto a sus propiedades nutricionales o saludables estaba precisamente relacionado con sus efectos “antinutricionales”, es decir, por disminuir la absorción y la digestibilidad de la comida debido a la habilidad de quelar minerales o de unirse a proteínas, provocando su precipitación, dando lugar a una disfunción de las enzimas digestivas, entre ellas las salivares dando lugar a la sensación de gusto astringente a muchas frutas y bebidas (Lambert y col., 2005). Sin embargo, el interés actual está dirigido hacia los beneficios sobre la salud debido al resultado de estudios en animales y epidemiológicos prometedores (Manach y col., 2004; Visioli y col., 2005).

En este sentido, hay que tener en cuenta que los animales no somos capaces de sintetizar compuestos fenólicos, así que dependemos fundamentalmente de la ingesta de productos de origen vegetal para incorporar estas sustancias a nuestro organismo.

Los compuestos fenólicos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de protones o electrones (Kinsella y col., 1993) y sus intermedios radicalarios son relativamente estables, a causa de la deslocalización por resonancia del electrón desapareado dentro del anillo aromático y a la carencia de posiciones adecuadas para el ataque provocado por el oxígeno molecular (Belitz y col., 2009; Sherwin, 1978). Cada fenol actuará por uno o más mecanismos de acción, según sus propiedades características (Cadenas, 1997), así la actividad antioxidante parece que se ve favorecida cuando el flavonoide tiene un grupo hidroxilo múltiple, siendo el 3',4',5'-dihidroxi (Figura 1.3), la configuración con más actividad. Otras configuraciones ordenadas de más a menos actividad son: un grupo 4-carboxi y un grupo 3-hidroxi libre en contraposición a un 5'-hidroxi (Figura 1.4) y doble enlace en posición 2 y 3 del anillo C, un grupo OH en 3 y un grupo carboxi en C4 (Hudson y col., 1983). Por otro lado, se ha observado que

las estructuras agliconas son más efectivas que sus correspondientes glicósidos, posiblemente debido a la falta de sustituciones 3-hidroxi en el anillo C (Figura 1.4) (Hayes y col., 1977; Ramanathan y col., 1992). Así, los ácidos hidroxicinámicos parecen poseer una mayor actividad antioxidante que los hidroxibenzóicos (Marinova y col., 1994). Aunque la actividad antioxidante ha sido tradicionalmente atribuida sólo a los compuestos fenólicos solubles (compuestos fenólicos extraíbles), estudios recientes sugieren que los compuestos fenólicos no extraíbles (taninos condensados) son mucho más efectivos en la captura de radicales peroxilo que los fenoles sencillos. Como estos compuestos no son absorbidos, podrían ejercer su actividad antioxidante a nivel del tracto intestinal. Así, estos compuestos son capaces de ejercer una importante actividad antioxidante frente a los ROS, de la que derivan su contrastada actividad antiinflamatoria y antiaterogénica (Bulotta y col., 2014).

En este sentido, el hidroxitirosol y sus derivados presentes en el aceite de oliva son los únicos compuestos fenólicos que han recibido la aceptación, por parte de la Unión Europea, para declarar su función antioxidante. De esta manera, la declaración “contribuye a la protección de los lípidos sanguíneos frente al estrés oxidativo” es aplicable tan solo para aceites de oliva que contengan 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol) por cada 20 g de aceite, que es el consumo diario recomendado para conseguir dicho efecto beneficioso.

Un efecto de esta actividad antioxidante es la inhibición de la oxidación de los lípidos presentes en lipoproteínas de baja densidad (LDL), y consecuentemente la formación de placas arteriales, trombos, cuya deposición en las arterias conlleva isquemias cardíacas agudas e infartos de miocardio (Frankel y col., 1993). Otras acciones antioxidantes permiten proteger el óxido nítrico (NO•) quien desempeña una función esencial de regulación de la presión arterial y la función endotelial (Gomez-Juaristi y col., 2011; Middleton y col., 2000; Nehlig, 2012).

Estas enfermedades cardiovasculares y algunas otras como artritis, diabetes y en cierta medida algunos tipos de cáncer, se denominan enfermedades crónicas con base inflamatoria (ECBI) ya que se basan en alteraciones de la respuesta inmune similares a las alergias. Las ECBI aparecen como consecuencias de la desregulación de los niveles de ciertos factores, citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la interleuquina-1 β (IL-1 β), la interleuquina-6 (IL-6) y de

ciertas enzimas pro-inflamatorias que median la producción de prostaglandinas, como la ciclooxigenasa-2, prostaciclina y leucotrienos como la lipooxigenasa (Martínez y col., 2013; Tomé-Carneiro y col., 2013). Tienen influencia sobre diversos procesos celulares, estrechamente relacionados con la membrana celular, como: la señalización (Spencer y col., 2001), el ciclo, el metabolismo del ácido araquidónico (Álvarez y col., 2004), la proliferación de células endoteliales causantes de angiogénesis (Stoclet y col., 2004), la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias (Schroeder y col., 2008). Todos estos mecanismos serían los responsables de la actividad antiproliferativa y anticancerígena observada para compuestos como las proantocianidinas oligoméricas presentes en los frutos secos (Tatsuno y col., 2012).

Existen estudios que demuestran la capacidad que ciertos compuestos presentes en el cacao, como los flavanoles o procianidinas, muestran a la hora de modificar la composición y la funcionalidad del sistema inmune (Massot-Cladera y col., 2011), disminuyendo la relación leucotrienos/prostaciclina en plasma y en las células aórticas endoteliales (Gómez-Juaristi y col., 2011) y ejerciendo un efecto frente a infecciones e inflamaciones intestinales (Monagas y col., 2010). En este sentido, los flavanoles del cacao han sido autorizados por la Unión Europea para poder emitir una declaración saludable, de tal manera que se podrá realizar la declaración “los flavanoles del cacao mantienen la elasticidad de los vasos sanguíneos, lo cual contribuye a mantener un flujo sanguíneo normal” atribuida a estos compuestos, si se produce un consumo diario de 200 mg de flavanoles de un grado de polimerización de 1 a 10.

Asimismo, los compuestos fenólicos también presentan efectos estrogénicos (Manach y col., 2004) y se ha estudiado el efecto preventivo de los estilbenos frente al Alzheimer, por su actividad antiagregativa contra la formación de fibrilos peptídicos β -amiloideos (Chaher y col., 2014).

Por otro lado, numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos frente al ataque de hongos, virus y bacterias, entre ellos los taninos hidrolizables, los antocianos y otros compuestos fenólicos presentes en la granada o en las pepitas de uva (Li y col., 2014; Tanveer y col., 2015; Teixeira y col., 2014b).

Asimismo, los compuestos fenólicos presentes en el té, cacao y café han mostrado tener una actividad anticariogénica debida a sus propiedades antimicrobianas, ya que son capaces de modular la microbiota bucal (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*) reduciendo tanto la formación del biofilm como de los ácidos derivados de la misma (Ferrazzano y col., 2009).

En contraposición los compuestos fenólicos podrían actuar como agentes oxidantes dañando diversas estructuras celulares (Lambert y col., 2007). Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un radical carboxilo lábil (quinonas y semiquinonas) o de un complejo flavonoide hierro lábil (Cadenas., 2008). De esta manera, podrían actuar como antioxidantes/prooxidantes y antimutagénicos/promutagénicos, dependiendo de los niveles consumidos y de las condiciones fisiológicas del organismo. En este sentido, se ha postulado que una exposición a niveles demasiado altos de flavonoides podría dañar el ADN o enzimas asociadas a él (Skibola y col., 2000; Xu y col., 2009). Los efectos que pueden provocar los flavonoides en condiciones prooxidantes son, entre otros, inducir apoptosis, producir citotoxicidad, disminuir la activación de factores de transcripción (como AP-1) y la expresión de moléculas de adhesión (como ICAM-1), suprimir la proliferación celular y la activación de la proteína quinasa e inhibir el crecimiento celular. Estas concentraciones no pueden ser alcanzadas fisiológicamente a través de la dieta, pero el uso de suplementos, como formulaciones antioxidantes y mezclas de hierbas puede suponer un nivel de exposición potencialmente tóxico (Skibola y col., 2000; Walzem, 2008).

En cualquier caso, se necesitan más estudios sobre la actividad y mecanismos de acción de los compuestos fenólicos, para entender mejor sus mecanismos de acción como agentes antioxidantes, anticancerígenos, cardioprotectores, antimicrobianos, antivirales y neuroprotectores (Aron y col., 2007; Larrosa y col., 2009b).

1.4. La uva como fuente de compuestos fenólicos bioactivos

1.4.1. Morfología del grano de uva

Los granos de uva presentan distintas características (forma, color, aroma, etc.) que principalmente provienen de la variedad, pero también pueden verse

modificadas por las condiciones edafoclimáticas. La estructura del grano de uva se describe en la Figura 1.22.

La parte más externa del grano de uva (exocarpio) corresponde a la piel y recibe el nombre de hollejo. Poder distinguir variedades blancas o tintas vendrá determinado por la cantidad de antocianos acumulados en esta zona (Reynier, 2007; Walker y col., 2006). Asimismo, el hollejo puede tener distinto grosor según la variedad.

El mesocarpio (pulpa) constituye la parte carnosa de la uva y representa más del 60% del volumen final de la baya. La pulpa contiene gran cantidad de sustancias entre las que predominan los azúcares, agua y ácidos orgánicos (Carmona y col., 2008). Generalmente la pulpa es incolora, aunque existen variedades conocidas como tintoreras, en las que existe materia colorante en las células.

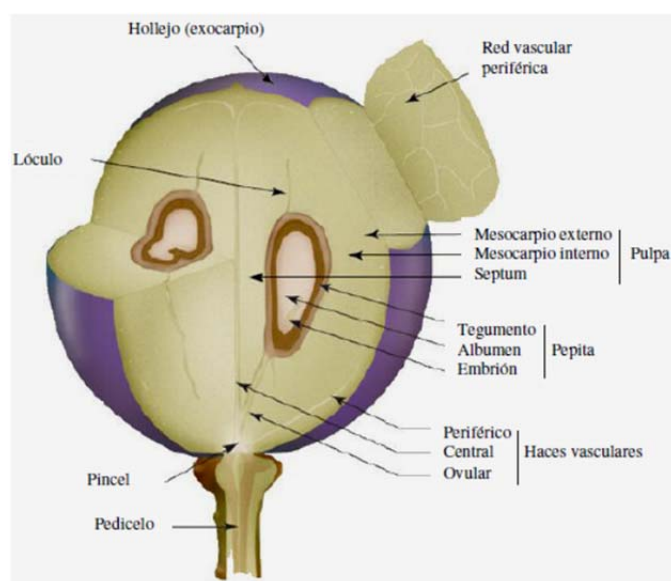


Figura 1.22. Estructura detallada de una baya de uva madura (Adaptada de Kennedy y col., 2002).

Las pepitas son el resultado de la fecundación de los óvulos de la flor. Se encuentra en la parte más interna del grano. Son ricas en aceites esenciales, y la cantidad, forma y dimensión es característica de cada variedad.

La concentración de compuestos en la uva depende de la variedad, de la climatología y del estado de desarrollo del grano. Hay variedades con granos más

pequeños que otras, con menos agua, y por tanto con mayor concentración. Asimismo, para una misma variedad con una menor pluviometría, los granos también van a ser más pequeños, por lo que va a aumentar la concentración de compuestos. (Soleas y col., 1997b).

1.4.2. Los compuestos fenólicos de la uva

Tal y como se acaba de comentar, el contenido de compuestos fenólicos en la uva depende tanto de la variedad de uva como de las condiciones de cultivo (González-SanJosé y col., 1990; Jordao y col., 1998; Nadal y col., 1995). Los fenoles en la uva tienen varias funciones como la coloración de las bayas, protección contra rayos ultravioletas y efecto biocida contra bacterias y hongos (Daniel y col., 1999; Heldt, 1997). Por lo tanto su síntesis viene inducida por estímulos externos como infecciones microbianas, rayos ultravioleta y heridas de la planta (Benhamou, 1996; Grisebach y col., 1978; Kuc, 1995; Matsuki, 1996), así como por la presencia de metales pesados y pesticidas, que provocan un estrés químico en la planta.

En la pulpa se encuentran esencialmente los compuestos no flavonoides mientras que los flavonoides están mayoritariamente en el hollejo, pepitas y raspón (Figura 1.23).



Figura 1.23. Composición fenólica del grano de uva (adaptado de Marin., 2017).

Los ácidos fenólicos se encuentran en todas las partes del fruto, pero la mayor concentración está en el hollejo del fruto maduro.

Los estilbenos son ampliamente sintetizados en el exocarpio, y en menor cantidad en la pulpa, antes del envero (Bavaresco y col., 2001). Tal y como se comentó, se sintetiza para combatir ataques fúngicos, radiaciones ultravioletas y metales pesados (Cantos y col., 2001; Cantos y col., 2002b; Shakibaei y col., 2009). A medida que nos acercamos a la maduración, las concentraciones de estilbenos bajan, por lo que es el momento de máxima debilidad del grano para ser atacado por patógenos. El declive de estas concentraciones puede ser debido al incremento de antocianos en la maduración de la uva, dado que los dos compuestos provienen de la cumaroil Coenzima A (Bais y col., 2000). El principal estilbeno de la vid es el resveratrol (isómero *trans*) (Jeandet y col., 2002). Con un tratamiento mediante luz UV es posible aumentar el resveratrol en la uva hasta en torno a 15 mg/kg. En el caso del vino, los niveles de resveratrol van a depender de la variedad de uva, de las condiciones climáticas, así como de los procedimientos enológicos empleados (tiempo y tipo de maceración), sin olvidar que según la metodología analítica empleada, los niveles también pueden ser sub y sobreestimados sustancialmente.

Asimismo, el contenido de resveratrol en uva determina la resistencia natural frente a los hongos *Botrytis cinerea* (podredumbre gris) (Sbaghi y col., 1995). Por su parte el hongo sintetiza un enzima que degrada el resveratrol, por esto una uva muy contaminada contiene menos resveratrol. La infección fúngica se previene o limita debido a que la síntesis del enzima es menor que la inducción del resveratrol (Soleas y col., 1997a) y a la síntesis de este compuesto en las uvas vecinas (Shakibaei y col., 2009).

Los flavanoles se pueden diferenciar entre tejidos por su grado de polimerización y por la proporción de las diferentes subunidades. Aproximadamente, la máxima concentración en las pepitas se produce dos semanas después del envero (Pillet, 2011).

Los flavonoles dan coloración amarilla en las variedades blancas. Esta coloración es una respuesta a la radiación UV-B (280-230 nm) que aumenta la síntesis de estos y de flavonas (Taiz y col., 2006). La presencia de flavonoles en la

baya empieza después del envero, unos días más tarde que empiezan a formarse los antocianos.

Por otra parte, la acumulación de los antocianos en el hollejo empieza después del envero y se va estabilizando durante la etapa de maduración, y es propio de la uva tinta (Parry y col., 2006).

Las referencias bibliográficas sobre el contenido de compuestos fenólicos en la uva o mosto son escasos comparado con las de vinos, y dependen del método de extracción, debido a que el análisis se realiza en muestras líquidas. En la Tabla 1.4 se recoge un resumen de los valores encontrados en uva o vino.

Tabla 1.4. Contenidos de compuestos fenólicos por familias.

| Familia | Concentración (mg/L) | Referencia |
|---|-----------------------------|--|
| Ácidos hidroxibenzoicos (gálico, sirínico, protocatéquico, vainílico, p-hidroxidobenzóico, galotaninos o elagitaninos) | 1 - 200 | Betés-Saura y col., 1996; Landrault y col., 2001; Pérez-Jiménez y col., 2010 |
| Ácidos hidroxicinámicos (caféico, ferúlico, coumarico, caftárico, coutárico) | 1 - 200 | Betés-Saura y col., 1996; Landrault y col., 2001; Pérez-Jiménez y col., 2010 |
| Estilbenos (resveratrol, piceído, viniferina, piceatanol) | 0,3 - 50 | Lamuela-Raventós y col., 1995; Kostadinoviæ y col., 2012; Pérez-Jiménez y col., 2010 |
| Flavanoles (catequina, epicatequina, procianidinas dímeros o trímeros, polímeros) | 8,6 - 3500 | Betés-Saura y col., 1996; Drewnowski y col., 2000; Pérez-Jiménez y col., 2010 |
| Flavonoles (quercetina, miricetina, kaemferol, luteolina, isoramnetina, galangina, rutina) | 3,29 - 200 | Fang y col., 2007; Pérez-Jiménez y col., 2010; Vuorinen y col., 2000 |
| Antocianos (glucósidos/acetilglucósidos/coumarilglucósidos de malvidina, peonidina, delfinidina, cianidina o petunidina, o polímeros) | 1 - 800 | Alén-Ruiz y col., 2009; Landrault y col., 2001; Pérez-Jiménez y col., 2010 |

1.4.3. Actividades biológicas asociadas a los compuestos fenólicos de la uva

Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos de la uva tienen su origen en la “paradoja francesa”, y aunque se propusieron varias hipótesis, la más respaldada es que el menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares es debido al consumo de vino (Renaud y col., 1992), y concretamente a los compuestos fenólicos del vino por su carácter antioxidante. Desde 1992 hasta la actualidad numerosos estudios apoyan esta hipótesis (Oak y col., 2004; Pandey y col., 2009).

En general, los compuestos fenólicos de la uva reducen la oxidación del LDL en un 50% con concentraciones de 1,9 a 57,7 µg/g de extracto (Anastasiadi y col., 2010; Janisch y col., 2006) lo que estaría relacionado con una menor incidencia aterogénica, y por tanto una reducción de la enfermedad cardiovascular (Esterbauer y col., 2014). La actividad antioxidante frente a la oxidación de las LDL de los ácidos hidroxycinámicos de la uva, mayoritariamente esterificados con el ácido tartárico, es superior en el ácido caféico > ácido sinápico > ácido ferúlico > ácido p-coumarico y equivalente en sus derivados esterificados. El motivo, como se ha mencionado en el punto 1.3.4, radica en la posición de los grupos hidroxilo (Arnous y col., 2009). Los siguientes compuestos más activos son los antocianos seguidos por los flavanoles, flavonoles y ácidos fenólicos de la uva, debido también a su estructura molecular (Teixeira y col., 2014a).

La catequina y el resveratrol, presentes en vinos blancos y tintos, tienen un efecto protector en la oxidación de *Saccharomyces cerevisiae* por peróxido de hidrogeno, cloruro de carbono y cadmio. El peróxido de hidrogeno y el cloruro de carbono producen una oxidación radicalaria, atacando proteínas e iniciando la peroxidación lipídica en la membrana celular, con disfunciones y necrosis. Por su parte el cadmio es un contaminante ambiental carcinogénico, que inactiva proteínas relacionadas con los sistemas de reparación del ADN y crea un estrés oxidativo que conlleva lesiones del ADN. El aumento en el nivel de tolerancia a estos oxidantes se debe a la acción de la catalasa. De esta manera, se observa una protección superior del resveratrol frente al cloruro de carbono. La reducción de la peroxidación lipídica de ambos compuestos, indica una protección frente la oxidación de la membrana celular (Howitz y col., 2003; Dani y col., 2008). El efecto del resveratrol depende de la dosis/concentración y es dependiente del tiempo (Pandey y col., 2010). Se ha descrito que el *trans*-resveratrol inhibe la liberación de las ROS y disminuye las

funciones trombogénicas de los leucocitos (Rotondo y col., 1998). Asimismo tiene un efecto quimiopreventivo en las múltiples etapas de un carcinoma (He y col., 2008).

Hay estudios donde se comparan compuestos fenólicos con distintos grados de actividad anticarcinogénica (Oi y col., 2008). Así, existe una relación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad para eliminar la proliferación de células cancerígenas del colon HT-29 u otras (Dwyer, 1996; Parry y col., 2006). Se observa un aumento significativo de colágeno tipo II y de proteoglicanos en células condrosarcoma humanas SW 1353 estimuladas con tert-butilhidroperóxido, así como una menor degradación del cartílago respecto al control y a las células estimuladas (Lucero y col., 2014). La potencial actividad anticancerígena de ciertos compuestos fenólicos, como el ácido elágico, los elagitaninos ha sido evidenciada *in vitro*, en cultivos celulares, pero también en algunos ensayos con ratones y ratas (Dorai y col., 2004; Maciel y col., 2004).

Asimismo, se ha descrito que 5-30 μM de epicatequina o 3-metilepicatequina protege el fibroblasto de la disfunción mitocondrial inducida por peróxido de hidrógeno, daño en la membrana de la célula y activación de la 3-caspasa (mediador esencial de la apoptosis o muerte celular programada, enfermedades autoinmunes o Alzheimer) (Spencer y col., 2001).

Los flavonoles, como la quercetina y sus derivados (glucosidada o con rutina), tienen propiedades antibacteriales, antivirales, antioxidantes, antiproliferativos, antiinflamatorios, y efectos anticarcinogénicos (He y col., 2008). La quercetina tiene mayor efecto anticancerígeno que la catequina, el ácido gálico y el resveratrol, aunque en el vino es más probable alcanzar la concentración efectiva de catequina o ácido gálico (Soleas y col., 2002).

El ácido gálico y el galato de etilo son los compuestos fenólicos que presentan una mayor actividad antimicrobiana frente al crecimiento de bacterias patógenas causantes de enfermedades respiratorias (Cueva y col., 2011). Asimismo, se ha demostrado la capacidad moduladora de la microbiota bucal del vino tinto y extractos enológicos (Muñoz-González y col., 2014).

Otros ácidos fenólicos como el 3,4-dihidroxifenil propiónico, el hidroferúlico o el dihidroxifenilacético, en cantidades de 30-50 mg/kg, tienen un efecto antiinflamatorio, provocando una reducción en el contenido de malonaldehído y en el daño oxidativo del DNA en colitis (Larrosa y col., 2009a; Larrosa y col., 2009b). Por su parte, entre 500-1000 mg/L de ácido protocatéquico reduce la incidencia y multiplicación de los tumores cancerosos en el colon (Monagas y col., 2010).

Asimismo, los dímeros de la procianidina B suprime biosíntesis de estrógenos relacionados con el cáncer de pecho (He y col., 2008).

Por último, conviene tener en cuenta que estos compuestos pueden tener efectos sinérgicos, de tal manera que al presentarse de forma conjunta pueden mejorar sus efectos beneficiosos que cada compuesto de forma aislada (Xu y col., 2009).

1.4.4. Estudios de biodisponibilidad

Una vez que se pone de manifiesto, mediante estudios *in vitro*, la actividad biológica de un compuesto se deben realizar ensayos de digestibilidad y disponibilidad para determinar los compuestos o metabolitos que alcanzan el plasma sanguíneo en humanos o animales y que, por tanto, pueden ser bioactivos. Estos ensayos se pueden realizar con modelos *in vitro* e *in vivo*. Un factor común en todos los estudios *in vivo* es la variabilidad entre individuos, la cual influye en la interpretación de los resultados.

El primer paso a tener en cuenta de cara a la realización de ensayos *in vivo* es la influencia del proceso digestivo en la composición de la muestra objeto de estudio, así como su potencial absorción intestinal posterior.

De esta manera, la digestibilidad de la muestra empieza con los dos principales fluidos biológicos que afectan a los compuestos fenólicos antes de alcanzar el intestino delgado, que son la saliva y los jugos gástricos. Los modelos *in vitro* reproducen las reacciones entre los compuestos fenólicos y estos fluidos (Tarko y col., 2013), y aunque existen varios tipos casi todos se basan en:

- Modelo mímico de boca, estomago (digestión gástrica) e intestino delgado (digestión duodenal). La boca se simula con la enzima α -amilasa en una solución salina tamponada. La digestión gástrica con una solución ácida (pH=

2) de una solución de enzima pepsina porcina, con una incubación a 37°C durante 2 horas. Y finalmente para el estudio de la digestión duodenal, se neutraliza pH y se añade jugo duodenal (sales biliares y pancreatina) y se vuelve a incubar 2 horas a 37°C. Al final del procedimiento se obtiene un sobrenadante y un pellet, donde se analiza la actividad biológica y/o el contenido fenólico por cromatografía (Miller y col., 1981; Ortega y col., 2009). La absorción duodenal se analiza con diálisis, donde se analizan los compuestos fenólicos por cromatografía, o con órganos de ratones (Gee y col., 1998).

- Absorción colónica. La capacidad de absorción transepitelial o basolateral de los compuestos fenólicos se mide usando una monocapa de células adenocarcinoma colónicas humanas Caco-2, que reproduce las condiciones de absorción en el intestino delgado. Para los experimentos de transporte, se deposita sobre un filtro de policarbonato, una capa de células Caco-2 y después se mide la actividad biológica y/o la concentración de los compuestos con cromatografía líquida a distintos tiempos de incubación (Henry-Vitarc y col., 2006). En estos modelos los cultivos celulares de Caco-2 y de hepatocitos son adecuados (Liu y col., 2005). Previamente se estudia la citotoxicidad ejercida por los diferentes compuestos, para lo cual se pueden utilizar diversas metodologías dentro de las cuales el ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolino) (Liu y col., 1997) es uno de los más utilizados.

Estos estudios en cultivos celulares muestran resultados distintos en función de la familia de compuestos fenólicos estudiados, así como del efecto de las proteínas, las grasas, la fibra, los carbohidratos, enfermedades y medicamentos sobre la biodisponibilidad (Scalbert y col., 2000; Urpí-Sardà, 2008; Ortega y col., 2009). Los compuestos fenólicos que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al intestino grueso, donde la microflora del colon tiene un papel muy relevante en la transformación de estos compuestos, puesto que dependiendo de los individuos (de su flora específica) pueden metabolizar los compuestos fenólicos en mayor o menor medida afectando a los niveles plasmáticos e intestinales de los metabolitos y, por tanto, influyendo directamente sobre su actividad biológica. El tracto gastrointestinal (TGI) humano está colonizado desde el nacimiento por complejas y diversas

colecciones de especies microbiológicas. El número y el tipo de bacterias son diferentes en cada parte del TGI, el intervalo va de muy pocas y con baja diversidad en el estómago a alta densidad y diversidad en el recto. Los trabajos pioneros basados en cultivos se complementan con estudios con técnicas moleculares en las últimas décadas (Delgado y col., 2006; Massot-Cladera y col., 2011).

1.4.5. Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* son imprescindibles para demostrar la bioactividad de una muestra o compuesto, como los compuestos fenólicos de la uva, una vez realizados los ensayos *in vitro* y demostrada su biodisponibilidad. Además, en la medida de lo posible, se debe conocer el mecanismo al que se atribuyen sus efectos beneficiosos.

Los estudios publicados en animales y humanos (Cerdá y col., 2004) demuestran que la actividad antioxidante *in vitro*, asociada a los compuestos fenólicos, no siempre coincide con la encontrada *in vivo* como consecuencia del metabolismo digestivo. Además los efectos sólo tienen un reflejo en la fisiología cuando forman parte de un hábito alimentario, y se ingieren durante un largo periodo de tiempo, cuando los síntomas de la enfermedad que ayudan a combatir todavía no han aparecido (Dragsted y col., 1993). Este comportamiento podría ser debido a una baja actividad biológica de estas moléculas, en comparación con la de los fármacos, lo que dificulta considerablemente probar su actividad en experimentos que se lleven a cabo durante periodos limitados de tiempo, como es el caso de la mayoría de los experimentos farmacológicos. Para estudiar estos efectos, que sólo se hace evidente a largo plazo, es necesario recurrir a estudios de tipo epidemiológico.

Los estudios *in vivo* pueden realizarse sobre múltiples organismos: serpientes, ratones, cerdos, conejos, aunque el modelo animal más utilizado son las ratas y ratones. El motivo de usar uno u otro organismo depende de cuestiones éticas, económicas y similitud genética. Por último, se llevan a cabo los estudios clínicos donde se demuestre la posible bioactividad de los compuestos objeto de estudio en el organismo humano.

1.4.5.1. Estudios con animales

Los estudios con animales deben manejarse de acuerdo con las recomendaciones de un Comité Ético, que se rige por un Real Decreto y una Ley

estatal sobre la protección de los animales de experimentación (Real Decreto español 53/2013 y Ley 32/2007, respectivamente). En estos documentos se fomenta el uso de métodos alternativos a la experimentación con animales vivos.

En los estudios con animales se considera interesante el conocimiento de la secuencia génica y la posibilidad de modificarla con disrupciones o mutaciones, lo que facilita la identificación de genes diana de moléculas o de patologías como el estrés oxidativo, para conocer los mecanismos de respuesta. También es importante la similitud de respuesta antioxidante en mamíferos y el conocimiento de genes ortólogos a los implicados en las enfermedades humanas (Dani y col., 2008; Kusuvara y col., 2002). La mayor parte de la bibliografía emplea ratones como modelo, debido a que cumplen con estos considerados y, además, son más económicos.

Los protocolos aprobados habitualmente realizan una pesada de los ratones al inicio y al final de las pruebas. Los animales son alimentados con dietas estándar, con un periodo de lavado de 15 días usualmente. Se administran los compuestos fenólicos en cantidades conocidas junto con la dieta (Gonthier y col., 2003) o directamente en el estómago, previa sedación (Crespy y col., 2002). La dieta también puede intervenir en el ensayo propiciando alguna enfermedad (hipercolesterolémica o cáncer, por ejemplo) (Montilla y col., 2006, Oi y col., 2008). La duración de los ensayos va desde los 10 minutos a las 12 semanas (Passamonti y col., 2005; Teixeira y col., 2014a) y los animales pueden permanecer vivos, en los estudios de metabolismo, o ser sacrificados, en los que se estudia el efecto en los órganos: estómago, cerebro, riñones, hígado y corazón. Como es lógico, las muestras son recogidas en consonancia con el estudio: orina, plasma, bilis y heces, en los estudios metabólicos, y en los de órganos, los biomarcadores propios del estudio.

Los parámetros habitualmente medidos en las muestras respecto a la actividad antioxidante son la concentración de compuestos fenólicos individuales, índice de compuestos fenólicos como absorbancia a 280 nm o los compuestos fenólicos totales (método del reactivo de Folin-Ciocalteu), colesterol total, LDL, HDL, creatinina, proteína total, albúmina, grado de digestión con la medida del polietilenglicol, concentración de urea, actividad enzimática antioxidativa (catalasa, superóxido dismutasa, glutatona peroxidasa) o actividad antioxidante del plasma (TEAC,

FRAP, ORAC, etc.), actividades enzimáticas (forma placentar de la glutatión-S-transferasa, actividad β -glucuronidasa y UDP-glucuronosiltransferasa, serum alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) concentración de glutatión reducida, malondialdéhido, 4-hidroxialquenos entre otros productos de la peroxidación lipídica, análisis de la microbiota intestinal (Crespy y col., 2002; Rodrigo y col., 2005a; Massot-Cladera y col., 2011).

En algunos estudios, a las ratas o ratones se les aplican técnicas como la administración gástrica *in situ* (introducción en el estómago del animal los compuestos fenólicos a estudiar junto con las sales biliares); posteriormente, a distintos tiempos se toman muestras del contenido del estómago, de sangre en la aorta abdominal, bilis o cerebro. Con estos ensayos se encontró que los glucósidos de flavonoles no se hidrolizaban en la digestión estomacal (Crespy y col., 2002; Piskula y col., 1999) ni se absorbían, aunque sí sus agliconas (Crespy y col., 2002) o que algunos compuestos fenólicos alcanzan el cerebro en pocos minutos, posiblemente por los intercambios entre sangre y fluido cerebroespinal (Passamonti y col., 2005). Otros experimentos demuestran que las agliconas se originan por medio de las bacterias del colon (Manach y col., 1995), mediante el análisis de heces. Los análisis de los compuestos fenólicos o actividad antioxidante en órganos, como el hígado, el riñón, el corazón, el pulmón aportan información sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Rodrigo y col., 2005b; Shakibaei y col., 2009). La ingesta de 2 mg/Kg a 5 g/Kg de compuestos fenólicos sintéticos en ratas, provocó en tan solo 10 minutos, durante 10 días, concentraciones en plasma de 1370 pmol/L de quercetina, 593 pmol/L de isoramnetina, 175 μ mol/L de resveratrol, 176,4 μ g/L de compuestos fenólicos en plasma en plasma (Manach y col., 1995; Juan y col., 1999). Además en el hígado se encontró 21,2 pmol/g de hígado en quercetina (Oi y col., 2008) y 192,2 ng/g de cerebro (Passamonti y col., 2005).

Estas medidas permiten concluir que los flavonoides en ratones, se conjugan en la absorción intestinal y circulan por los vasos sanguíneos en los individuos sanos, aumentando la actividad antioxidante de la orina (Gonthier y col., 2003). De esta manera, pueden evitar el daño renal de dietas hipercolesterolémicas y tienen un papel neuro- y nefroprotector frente el estrés oxidativo del cerebro, hígado y riñón (Montilla y col., 2006; Oi y col., 2008). Este efecto se atribuye a la neutralización de

especies reactivas de oxígeno junto con una quelación metálica (Passamonti y col., 2005).

Respecto a la actividad antiinflamatoria, íntimamente ligada al aumento del estrés oxidativo los principales mecanismos usados por las células para participar en reacciones inmunitarias e inflamatorias son la producción de citoquinas. así como respuestas a citoquinas. En este sentido la formación de interlequinas IL-1 β , IL-6, así como el factor de necrosis tumoral TNF- α , se han relacionado con una respuesta celular frente a la inflamación (He y col., 2008).

La actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos del vino tiene un efecto homólogo *in vivo*, del tal manera que contribuye a la disminución de la peroxidación lipídica en riñón, hígado y pulmón en ratones dependiendo de la dosis (Rodrigo y col., 2005b). La ingesta de 200 mL de vino tinto conduce a concentraciones de 21 mg/día o 600 μ g/L de catequinas en suero, reduce un 24-48% las áreas con lesiones ateroscleróticas asociado a la reducción de la oxidación de las LDLs, evitando su agregación plaquetaria (Sparwel y col., 2009) en ratas modificadas y a la activación de la óxido nítrico sintetasa que puede revertir dicha oxidación (Slowing y col., 2001). El consumo de 250 mg de hollejo/kg presenta efectos antiinflamatorios significativos en ratas obesas: reducen el colesterol a la mitad y aumentan las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) un 26%. Bajan la presión sanguínea, inhiben la agregación plaquetaria y activan nuevas proteínas que previenen la senescencia celular. Limitan la adsorción de grasas, acumulación y actúan en la inhibición del metabolismo graso de las enzimas lipasa pancreática y lipoproteína lipasa (Teixeira y col., 2014a).

Por su parte, la enzima β -glucuronidasa, aumenta su concentración en condiciones anormales tales como en presencia de un carcinoma. En este sentido, las agliconas disminuyen la actividad β -glucuronidasa previniendo el daño en los tejidos (Oi y col., 2008).

Otros compuestos fenólicos de alto peso molecular, como proantocianidinas o polímeros de fenoles oxidados, no se absorben y son metabolizados por la flora intestinal en ácidos aromáticos (4-hidroxifenilacetico o 3,4-dihidroxifenilacetico) con propiedades antioxidantes mayores que sus precursores (Gonthier y col., 2003). Estos compuestos modulan la composición de la flora intestinal y la respuesta inmune

(Massot-Cladera y col., 2011). Así 50 mg/Kg de compuestos fenólicos reducen malonaldehído y daño oxidativo del DNA en colitis (Larrosa y col., 2009a). Y unos 0,1g/kg/día de compuestos fenólicos, ingeridos por sonda nasogástrica, en ratones infectados por *Toxoplasma gondii*, se observa que se duplica el tiempo de vida, respecto control, y disminuye la inflamación intestinal, regulando la respuesta inmune tipo Th1 y previene la translocación bacteriana, manteniendo la función barrera del intestino (Bereswill, 2010).

Antes de los estudios clínicos es habitual realizar un estudio de toxicidad siguiendo las recomendaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD). Esta organización elabora una Guía de métodos para productos químicos, y en su capítulo cuarto (Efectos sobre la Salud) se pueden encontrar hasta 150 métodos acordados a nivel internacional, para conocer la repercusión sobre la salud de extractos o productos puros. Se basa en la determinación de la dosis letal (LD₅₀) o dosis de producto que mata al 50% de los animales del ensayo. En Estados Unidos, ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) aprobó en el 2007 dos ensayos de citotoxicidad basal *in-vitro* para utilizar en los estudios de toxicidad, el ensayo de captación de rojo neutro utilizando fibroblastos 3T3 de ratón (3T3 NRU assay) y queratinocitos normales humanos (NHK RNU assay) (ICCVAM, 2008).

Estos estudios de citotoxicidad se realizan normalmente en ratones y en dosis hasta 5.000 mg/kg. Por ejemplo, el *trans*-resveratrol, aplicado a una concentración miles de veces superiores a la ingesta normal de una persona, durante 28 días, no provocó toxicidad en ratones (Juan y col., 2002). De la misma manera, extractos de pepitas y hollejos de uva a dosis de 500, 1.000 y 2.000 mg/kg no dieron lugar a ningún efecto clastogénico (mutagénesis o carcinogénesis) ni toxicidad en animales (Erexson, 2003).

1.4.5.2. Estudios clínicos

Los estudios epidemiológicos y estudios clínicos realizados en humanos, sugieren que los antioxidantes de la dieta, y en particular los compuestos fenólicos, pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento o enfermedades crónicas con base inflamatoria (ECBI), como son la arteriosclerosis, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas e incluso

enfermedades respiratorias (Shaheen y col., 2002; Halvorsen y col., 2006; Walzem, 2008). La demostración de este efecto para un compuesto o grupo de compuestos específico no es fácil, posiblemente debido al efecto complementario de otros antioxidantes de la dieta (frutas y vegetales) (Svilaas y col., 2004). Por el contrario, otros apoyan una asociación entre ingesta de vino y menor riesgo cardiovascular, pero estos estudios lo relacionan con un estilo de vida, dieta, y otros factores culturales (Goldberg y col., 2001). En este sentido, en un estudio realizado con 48.763 holandeses durante 2 años se relacionaba el consumo de vino con una mayor ingesta de fruta, pescado, vegetales cocidos, ensaladas y aceite de oliva, lo que más tarde se llamaría dieta mediterránea (Tjonneland y col., 1999). Se trata de alimentos ricos en compuestos antioxidantes que interfieren en el resultado, así como la evolución de los alimentos en los estudios prolongados (Halvorsen y col., 2006). Asimismo, estos factores podrían estar relacionados con que los efectos de los compuestos fenólicos de la uva no fueran consistentes.

El efecto de la dieta sobre la actividad antioxidante diaria ingerida, se puede calcular mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos (FFQ), que considera también la contribución de bebidas como el café o el té en la ingesta de compuestos fenólicos (Pellegrini y col., 2007).

Al igual que los estudios con animales, en los estudios clínicos también se lleva a cabo la determinación de ácido úrico, bilirrubina, albumina, GGT, antioxidantes endógenos, así como el perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, relaciones entre ambos y triglicérido) (Hennig y col., 1960; Leighton y col., 2000; Ruiz-Rodríguez y col., 2012), proteína C-reactiva (Noguer y col., 2012) y biomarcadores inflamatorios (Castilla y col., 2006) en relación con el efecto antioxidante de un determinado compuesto o muestra. Sin embargo, a diferencia de los ensayos preclínicos, estas medidas sólo pueden realizarse en biofluidos (sangre u orina) o heces. La correcta conservación de las muestras de orina es imprescindible, para evitar cambios debidos al metabolismo de las bacterias presentes y deben evitarse siempre que sea posible los ciclos de congelación de la muestra para evitar la degradación de la misma (Saude y col., 2007).

Asimismo, en los ensayos de digestibilidad y biodisponibilidad *in vivo* en humanos se mide un compuesto fenólico cuantificándolo por cromatografía líquida

en plasma o en orina, tras la ingestión de alimentos con cantidades conocidas (Urpí-Sardà y col., 2005; Urpí-Sardà, 2008; Rechner y col., 2002a, Muñoz-Gonzalez y col., 2013), tal como se ha realizado en el estudio de esta memoria.

Las dosis empleadas se sitúan entre los 50 – 500 mL o $7,7 \pm 1,2$ mL/kg/día de mosto o vino tinto (Stoclet y col., 2004; Mori y col., 2015). Otros estudios utilizaron 700 mg de extracto de uva (Yubero y col., 2013) o vino tinto, con un contenido de compuestos fenólicos de 2600-2900 miliequivalentes de Ácido gálico/día, o 101 - 837 mg compuestos fenólicos/día (Rajdl y col., 2006; Koli R y col., 2010), con y sin alcohol (30 g alcohol/día) (Chiva-Blanch y otros., 2012). Algunos estudios dan dosis por comida, por ejemplo 621 mg catequina equivalente/comida (Gorelik y col., 2008). Y hay que se centran en un compuesto, por ejemplo 0,357 – 2,56 mg resveratrol/día (Zamora-Ros y col., 2006), o familias de ellos: 5.38 mg/L de estilbenos (Urpí-Sardà y col., 2005) o 0,9 – 30 mg flavonoles, con β -caroteno y vitamina C /día (Kim y col., 2003).

La duración de los estudios es muy variable (desde 0,5 horas hasta 5 semanas) (Stoclet y col., 2004; Yubero y col., 2013), así como el número de participantes (desde 10 hasta 80 personas sanas o con algún síndrome metabólico conocido) (Zamora-Ros y col., 2006; Noguer y col., 2012). Asimismo, el tipo de estudio puede ser prospectivo, abierto, aleatorio, cruzado, controlado o cohorte.

A partir de los resultados obtenidos en estudios clínicos con extracto de uva tinta o vino blanco, se ha puesto de manifiesto que el consumo de compuestos fenólicos estaría relacionado con una reducción del colesterol total y LDL, y apolipoproteína B-100, un aumento en la capacidad antioxidante, vitamina E en sangre, HDL-colesterol y apoproteína A-I (Castilla y col., 2006; Rajdl y col., 2006; Yubero y col., 2013). Además reduce la presión sanguínea o no la modifica (Chiva-Blanch y otros., 2012; Mori y col., 2015). Así como el vino tinto en concentraciones de 3 mg/L compuestos fenólicos, tiene un efecto vasorelajante por activación de la ruta del NO y previene la expresión del VEGF, un factor proangiogénico (Stoclet y col., 2004), y además reduce la formación de MMP-2, como respuesta de la trombina (Oak y col., 2004). Un extracto de vino tinto, de 218 mg de compuestos fenólicos, reduce la absorción de grasas, evitando la peroxidación y absorción (Gorelik y col., 2008). El vino tinto sin alcohol aumenta la actividad de los enzimas antioxidantes

(Superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa), las responsables de eliminar los ROS (Noguer y col., 2012). Seguramente debido al cambio de la flora intestinal, observado en vino, con o sin alcohol, ingerido por personas con síndrome metabólico, donde aumentó el número de bifidobacterias fecales y *Lactobacillus* y las bacterias productoras de butirato, a expensas de *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* (Moreno-Indias y col., 2016). En estudios epidemiológicos e intervencionales, los metabolitos del resveratrol en orina pueden ser tomados como biomarcadores de ingesta de vino (Zamora-Ros y col., 2006).

A pesar de estos resultados, aún no se puede evidenciar el efecto de las bebidas en base uva en la salud humana, de esta manera, se pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios clínicos, como el que se presenta en esta memoria, apoyándose en los conocimientos adquiridos sobre biomarcadores relacionados con el riesgo cardiovascular, y centrándose en el efecto de los compuestos fenólicos en los mismos.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos

Las enfermedades cardiovasculares se sitúan a la cabeza de las principales causas de mortalidad en los países industrializados (OMS., 2016). Este tipo de enfermedades son debidas a una combinación de factores ambientales, genéticos y metabólicos, que actúan de forma sinérgica, donde las situaciones de estrés oxidativo juegan un papel importante. En este sentido, son numerosos los estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de alimentos antioxidantes, entre ellos frutas, verduras y derivados (como el vino), pueden ayudar a disminuir el riesgo a padecer dichas enfermedades, debido a la presencia, entre otros, de compuestos fenólicos (Chiva-Blanch y col., 2012; van Velzen y col., 2014).

Hasta la fecha, son escasos los estudios centrados en analizar la influencia de la variedad de uva en las características antioxidantes de los productos derivados de ella. De esta manera, el bajo número de variedades empleadas limita mucho la repercusión de los resultados obtenidos. Asimismo, a día de hoy los estudios *in vivo* realizados a partir de matrices vínicas han obtenidos resultados controvertidos.

De esta manera, el objetivo principal del presente trabajo fue el estudio de la uva como fuente de compuestos fenólicos antioxidantes de cara al desarrollo de vinos, bebidas o nuevos ingredientes con propiedades cardiosaludables para el organismo humano.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Determinar qué variedades de uva blanca y tinta resultan más adecuadas para la formulación de una bebida o vino con alto potencial antioxidante.
- Dilucidar el posible papel desempeñado por los compuestos fenólicos, así como por cada una de las familias de compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de variedades de uva blanca y tinta.
- Definir la influencia del etanol en las características tanto antioxidantes como de perfil fenólico de los extractos obtenidos a partir de uva.
- Conocer las propiedades bioactivas (actividad antioxidante y antiinflamatoria), así como la biodisponibilidad de extractos obtenidos a partir de hollejos de uva, de cara a la formulación de bebidas saludables.

- Analizar el efecto cardiosaludable *in vivo*, tanto en un modelo animal como en humanos, de extractos obtenidos a partir de hollejos de uva dotados de un alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes.

2.2 Plan de trabajo

El plan de trabajo que se ha seguido en el desarrollo de esta memoria para alcanzar los objetivos propuestos se presenta a continuación:

- Estudio de la actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos obtenidos a partir de variedades de uva blancas y tintas, mediante el ensayo del radical DPPH[•] y del blanqueamiento del β -caroteno.
- Determinación del índice de compuestos fenólicos totales (IPT), así como de la composición fenólica de los extractos, mediante el análisis cromatográfico (UPLC o HPLC-RP-PAD) de los monómeros mayoritarios en función de su familia fenólica: flavanoles, flavonoles, antocianos, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos.
- Estudio de la relación existente entre ambas metodologías de actividad antioxidante y el contenido global y por familias de compuestos fenólicos, mediante el empleo de análisis estadísticos (coeficientes de correlación y análisis de componentes principales).
- Análisis de las condiciones de extracción (variedad de uva, temperatura y porcentaje de agua: etanol) más adecuadas de cara a la obtención de un extracto a partir de hollejos de uva con alto potencial antioxidante.
- Determinación de la actividad funcional en cultivos celulares de los extractos de hollejos que presenten las mejores características, en base a la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes, a la actividad antiinflamatoria celular y a su expresión génica.
- Estudio de la influencia de una bebida con alta capacidad antioxidante formulada a partir de un extracto de hollejo de uva blanca sobre distintos marcadores de riesgo cardiovascular (datos antropométricos, marcadores metabólicos y de estrés oxidativo) en un modelo animal.
- Estudio de la influencia de una bebida con alta capacidad antioxidante obtenida a partir de un extracto de hollejo de uva tinta sobre distintos marcadores de riesgo cardiovascular (medidas antropométricas, capacidad antioxidante del plasma, perfil lipídico, metabolismo de la glucosa y marcadores de inflamación) en el ser humano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Extractos de uva

3.1.1. Obtención de extractos

3.1.1.1. Extractos procedentes de uva

En este estudio se partió de racimos de uva de 46 variedades de *Vitis vinífera*, de las cuales 20 correspondieron a uvas blancas (Figura 3.1) y 26 a uvas tintas (Figura 3.2), todas ellas pertenecientes a la colección de cultivos de Miguel Torres S.A. (Vilafranca del Penedès, Barcelona). Estas variedades se escogieron por ser representativas de la zona noreste de la península ibérica, o en algunos casos por su gran repercusión a nivel internacional. Asimismo, se incluyeron nueve variedades ancestrales catalanas recuperadas por esta bodega: Garró, Cua tendra y siete denominadas con la palabra Variedad y un número: 4, 8, 30, 31, 32, 33 y 34. Dicho número corresponde a una catalogación anterior de variedades ancestrales recuperadas, donde las anteriormente citadas eran las que daban lugar a los vinos más interesantes. Cabe destacar que la variedad Garró se encuentra actualmente registrada como variedad comercial española, mientras que otras están inmersas en dicho proceso.

Se recolectaron entre 1 y 5 kg de uva de cada variedad, en su grado de madurez óptimo (21-22° Brix para uva blanca y 23-25° Brix para uva tinta), durante los meses de agosto a octubre de la añada 2008, respetando la integridad de los granos. Una vez vendimiados, los racimos se guardaron a -20°C en bolsas hasta su posterior procesamiento.

Se partió siempre de granos de uva enteros, pesándose aproximadamente 25 g de uva. Esta operación se realizó por duplicado. Una vez obtenidos los extractos, se tomaron dos alícuotas de cada uno de ellos, analizándose por separado. De esta manera, por cada variedad y tipo de extracto se llevaron a cabo 4 repeticiones.

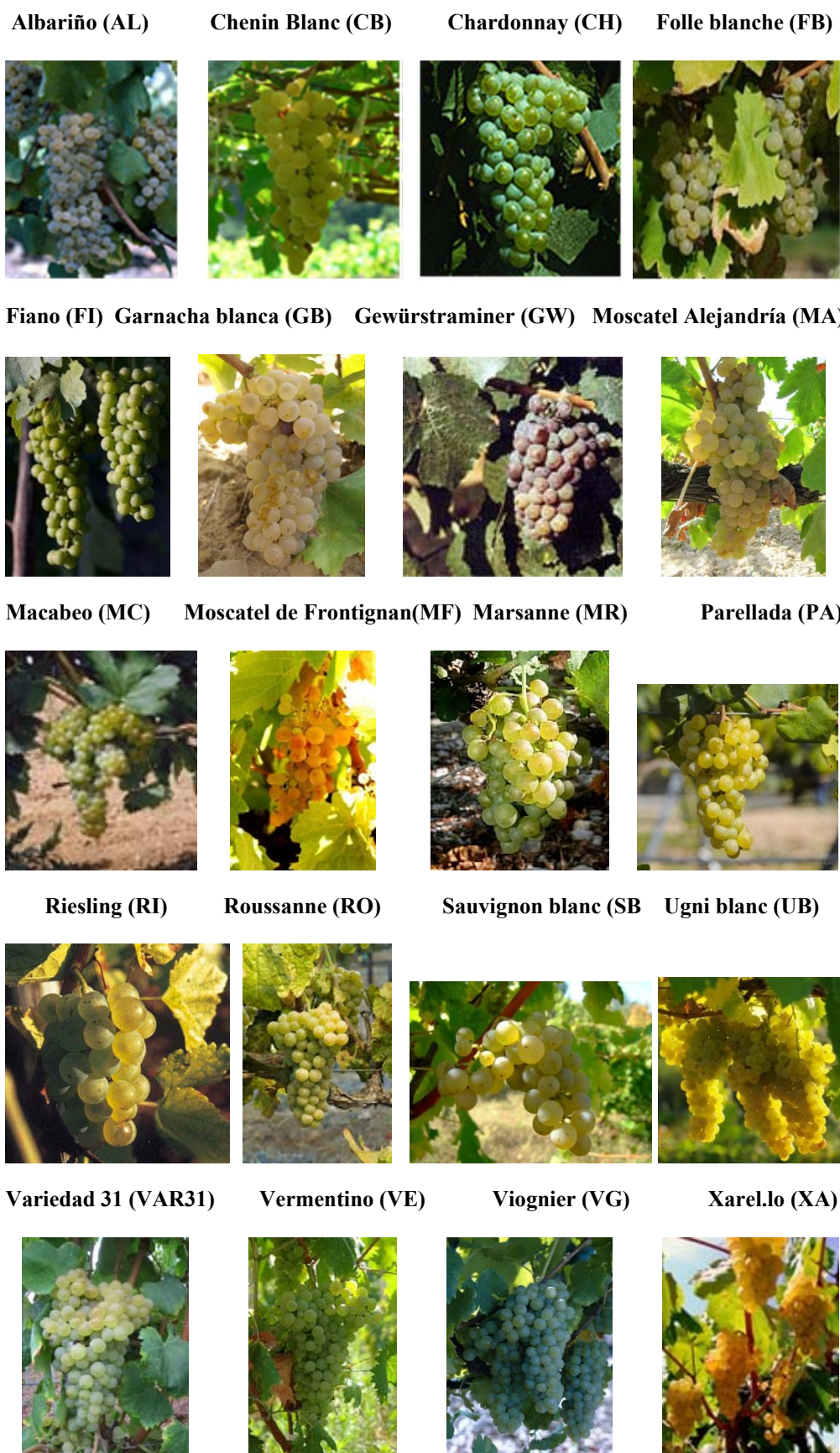


Figura 3.1. Variedades de uva blanca y abreviatura utilizada a lo largo de la memoria.

Alicante bouchet (AB) Beltza (BE) Cariñena (CA) Cabernet franc (CF)



Cinsault (CI) Cabernet sauvignon (CS) Cua tendra (CT) Garró (GA)



Garnacha tinta (GN) Monastrell (MN) Merlot (MT) Negret (NE) Panella (PAN)



Pinot Noir (PN) Petit verdot (PV) Syrah (SH) Tannat (TA) Tempranillo(TE)



Touriga nacional(TN) Variedad 4(VAR4) Variedad 8(VAR8) Variedad 30(VAR30)



Figura 3.2. Variedades de uva tinta y abreviatura utilizada a lo largo de la memoria.

Variedad 32 (VAR32) Variedad 33 (VAR33) Variedad 34 (VAR34) Zinfandel (ZF)



Figura 3.2. (Cont.). Variedades de uva tinta y abreviatura utilizada a lo largo de la memoria.

A continuación se detalla el protocolo llevado a cabo para cada una de las extracciones.

Extractos acuosos

Para la obtención de los extractos acuosos se trituraron 25 g de uva en un Ultraturrax IKA-T18 Basic (Scharlau, España) a 15.000 rpm durante 10 segundos, tiempo suficiente para provocar la ruptura de todos los granos y evitar, en la medida de lo posible, la disgregación de las pepitas de uva. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante por decantación y se midió el volumen de mosto obtenido. A continuación, se enrasó en matraz aforado a 25 mL con agua Milli-Q y se filtró sobre papel. Por último, se realizó una segunda filtración con membranas de nailon de 0,45 μm (Tecknokroma, España) y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

Extractos etanólicos

Respecto a la obtención de los extractos etanólicos y teniendo en cuenta el volumen de mosto obtenido en los extractos acuosos, se añadió etanol absoluto a la muestra (25 g de uva), de tal manera que el contenido de etanol en el extracto final se aproximara al 12%. A continuación se trituró la uva de manera similar a la descrita para los extractos acuosos. Posteriormente, el extracto se incubó en un baño de aire orbital (Stuart SI50, España) protegido de la luz durante 2 h a 45°C con una agitación constante de 200 rpm. Finalizada la incubación, el extracto etanólico obtenido se sometió al mismo proceso ya descrito para los extractos acuosos. El líquido obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

Extractos procedentes de hollejos

En el proceso de vinificación se genera un subproducto, los hollejos, rico en compuestos fenólicos, de los que se puede obtener un extracto que permita el desarrollo de una bebida funcional. Con el objetivo de conocer las condiciones más favorables para la obtención de una bebida dotada de una alta actividad antioxidante, se probaron varias temperaturas y relaciones hidroalcohólicas (datos no mostrados) designadas como 1, 2 o 3 en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Descripción de los extractos procedentes de hollejos realizados.

| VARIEDAD | DENOMINACIÓN |
|-----------------|---------------------|
| Garnacha blanca | GB 1 |
| | GB 2 |
| | GB 3 |
| Parellada | PA 1 |
| | PA 2 |
| | PA 3 |
| Riesling | RI 1 |
| | RI 2 |
| | RI 3 |
| Merlot | MT 1 |
| | MT 2 |
| | MT 3 |
| Cinsault | CI 1 |
| | CI 2 |
| | CI 3 |

3.1.2. Determinación de la actividad antioxidante.

3.1.2.1 Ensayo de la captación de radicales libres DPPH•

Se utilizó el protocolo descrito por Brand-Williams y col., 1995), basado en la medida espectrofotométrica de la concentración de radicales DPPH• presentes en el ensayo en presencia de la muestra. Se prepararon cuatro diluciones diferentes de cada extracto, de tal manera que se añadieron 25 µL de cada dilución a 0,975 mL de

una disolución de DPPH[•] (23,5 mg/mL en metanol) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) dejándose reaccionar hasta la completa estabilización de la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresaron como valor TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) en mmol trolox/L de extracto. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Con el fin de corregir el posible error espectrofotométrico atribuible a la interferencia entre el color de los extractos de uva tinta y el del radical DPPH[•], se realizaron blancos de todos los extractos, mezclando 25 µL de extracto con 0,975 mL de metanol puro. En las condiciones del ensayo, se observó que ningún extracto presentaba un valor apreciable de absorbancia a 517 nm.

3.1.2.2. Ensayo del blanqueamiento del β-caroteno

El método está basado en una versión modificada del protocolo propuesto por Gazzani y col., 1998) en la que se utilizó agua Milli-Q y el tiempo de reacción estipulado fue de 120 minutos.

Para cada ensayo se utilizaron 3 diluciones distintas de la muestra: muestra sin diluir, dilución 1/5 y 1/10 para las muestras procedentes de uva blanca y dilución 1/5, 1/10 y 1/20 para las procedentes de uva tinta.

Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante (AA) mediante los siguientes cálculos:

$$AA (\%) = [(dr \text{ control} - dr \text{ muestra})/dr \text{ control}] \times 100 \quad \text{donde}$$

$$dr \text{ control} = \ln (\text{Abs } t=0 \text{ del control}/\text{Abs } t=120 \text{ control})/120$$

$$dr \text{ muestra} = \ln (\text{Abs } t=0 \text{ de la muestra}/\text{Abs } t=120 \text{ muestra})/120$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.1.2.3. Ensayo de la captación de radicales libres ABTS^{•+}

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos sólido/líquido procedentes de subproductos de uva se utilizó el ensayo del ABTS, basado en la reducción del radical catiónico ABTS^{•+} en presencia de un compuesto con actividad antioxidante. El método empleado se basa en el protocolo descrito por Re y col., 1999). Para el ensayo de actividad antioxidante se prepararon 4 diluciones

diferentes de cada extracto, que se añadieron a la solución de radical ABTS^{•+} diluido. Los resultados se expresaron como valor TEAC (mmol trolox/L de extracto). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.1.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se determinó en los extractos sólido-líquido obtenidos a partir de hollejos utilizados en los estudios *in vivo* (GB2 y MT3).

3.1.3.1. Cultivos celulares

La actividad antiinflamatoria de los extractos se estudió utilizando la línea celular de monocitos THP-1 (TIB-202, American Type Culture Collection (ATCC), España).

Durante el crecimiento y mantenimiento del cultivo celular se empleó el medio de cultivo RPMI 1640, suplementado al 10 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1 % de HEPES, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, España) y 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, España). El cultivo de monocitos se mantuvo a una densidad en torno a $2 - 9 \times 10^5$ células/mL en un incubador (Binder, Alemania), en condiciones constantes de temperatura y CO₂, 37 °C y 5 % de CO₂, respectivamente.

La adición de PMA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 100 ng/mL a la suspensión celular permitió la diferenciación de monocitos a macrófagos, mediante su incubación durante 48 h, lo que permitió su completa diferenciación celular (Takashiba y col., 1999).

3.1.3.2. Viabilidad celular. Ensayo MTT.

Como paso previo a los ensayos de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo la determinación de la dosis máxima utilizable de los productos a ensayar que no causara toxicidad en el modelo celular THP-1/macrófagos. Para ello se realizó el ensayo general de viabilidad celular MTT. Se midió la toxicidad de los distintos extractos utilizados frente a monocapas de células, utilizando bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolino (MTT), según el método propuesto por Mosmann, 1983). El MTT es un compuesto de color amarillo soluble en agua que es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas (pero no por las

mueras) formando un compuesto de color púrpura e insoluble en agua. Por tanto, la cantidad de células viables será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos, con 5×10^4 macrófagos por pocillo, con cantidades crecientes de extracto y tras 24 horas de incubación se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron de nuevo con 100 μ l de una solución 0,5 mg / ml de MTT durante 2 horas a 37° C y 5% de CO₂. El medio fue descartado y se añadieron 100 μ l de un buffer de lisis (sulfóxido de dimetilo: etanol en proporción 1:1). Después de 30 min de incubación, Se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas Sunrise Remote (Tecan, Suiza). La densidad óptica del formazán producido por las células de los pocillos control, aquellos donde no se adicionó ningún extracto, se tomó como la máxima viabilidad, comparándose con la absorbancia del resto de tratamientos.

3.1.3.3. Medida de la actividad antiinflamatoria

Tal y como se ha indicado previamente, en este ensayo se emplearon macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1, a los cuales se les adicionaron LDLox (50 mg/mL) proporcionadas por el Servicio de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España). Estas LDLs se oxidaron siguiendo el protocolo descrito por Steinbrecher, 1987) que, de forma resumida, consistió en la preparación de una disolución de LDL con 5 μ g/mL de CuSO₄ (Sigma-Aldrich, España) e incubación posterior durante un periodo de 3 horas en agitación mantenida a 37 °C. Una vez comprobada la correcta oxidación de las LDL, se adicionan al medio de cultivo 75 μ g/mL de LDLox.

Los macrófagos estimulados con LDLox se consideraron como controles positivos. Los distintos extractos se adicionaron a las LDLox, manteniéndose los tratamientos durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurridos los tiempos de incubación, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a -20 °C para la posterior determinación de la secreción de citoquinas.

3.1.3.4. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de citoquinas.

Para estudiar el efecto de los extractos de hollejos en la secreción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos humanos fueron tratados como anteriormente se ha descrito. La cuantificación de las citoquinas se llevó a cabo

mediante el empleo de un ELISA. El medio, tras el tratamiento con los extractos, se recogió y a continuación, se centrifugó a 12.000 rpm para eliminar los desechos, y se almacenó en un arcón a -80° C hasta el análisis de las citoquinas.

Con este propósito se utilizó un kit de ELISA tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (BD OptEIA Sets de BD Biosciences, España). En este ensayo se determinó la secreción de las interleuquinas de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Microtest, BD Falcon, España), tratadas específicamente para permitir la adhesión del anticuerpo primario de cada una de las citoquinas cuya concentración se determinó. A cada pocillo se añadieron 100 μ L de la solución de anticuerpo primario incubándose durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavó la placa y se acondicionó durante una hora. Posteriormente, se adicionaron en la placa las muestras que forman las curvas patrón de las distintas citoquinas a estudiar (100 μ L) y las muestras procedentes de los ensayos de actividad antiinflamatoria. De las muestras procedentes del modelo de inflamación utilizando macrófagos activados por LPS se incorporaron 10 μ L para la determinación de TNF- α , 10 μ L para IL-1 β , 20 μ L para IL-6 y 100 μ L para IL-10, mientras que para el modelo dependiente de oxidación los volúmenes empleados fueron de 40 μ L para TNF- α , 60 μ L para IL-1 β , 80 μ L para IL-6 y 100 μ L para IL-10.

Las muestras y las rectas patrón se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron los lavados en las placas y se incorporaron 100 μ L de la solución de anticuerpo secundario junto con la enzima que va a permitir la cuantificación de la citoquina. Tras una hora de incubación en oscuridad del anticuerpo secundario y la enzima, se realizó una nueva etapa de lavado y se incorporaron 100 μ L de la solución de sustrato de la enzima, que da lugar a un compuesto coloreado. Tras 30 minutos de tiempo de reacción, ésta se detiene incorporando en los pocillos 50 μ L de H₃PO₄ 1 M (Sigma-Aldrich, España). Finalmente, se determinó la absorbancia de los pocillos a 450 nm, con una corrección a 570 nm en un lector de placas (Tecan, Suiza). Los resultados se cuantificaron como pg de citoquina/g de proteína, para lo cual se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo de Bradford utilizando el reactivo correspondiente (Bio-Rad, Hemel, Hempstead, Reino Unido). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.4. Determinación de la composición fenólica

Se llevó a cabo la determinación de la composición fenólica en los extractos procedentes de uvas, con el objetivo de intentar relacionar la actividad antioxidante con el perfil fenólico. Tal y como se describe a continuación, se utilizaron cinco métodos: uno espectrofotométrico, para la determinación global de contenido en compuestos fenólicos, y cuatro cromatográficos, por HPLC, distintos en función del tipo de compuesto fenólico que se deseaba identificar.

3.1.4.1. Índice de polifenoles totales (IPT)

El IPT se midió espectrofotométricamente a 280 nm con un espectrofotómetro Helios γ (Thermo, EE.UU.) con una cubeta de cuarzo de 1 cm de grosor, previa dilución del extracto a 1/10 o 1/100 dependiendo de si se trataba de uva blanca o tinta, respectivamente (Ribéreau-Gayon, 1972).

3.1.4.2. Análisis por HPLC

Ácidos hidroxibenzóicos y flavanoles

El análisis cromatográfico de los ácidos hidroxibenzóicos y los flavanoles se realizó siguiendo el método propuesto por Ibern-Gómez y col., 2002), adaptado a un cromatógrafo de líquidos de ultra eficacia (UPLC). Se empleó el modelo Acquity (Waters, EE.UU.), con un detector de UV-Visible fotodiodo array (UV-PAD), utilizando el sistema Empower Pro® (Waters, EE.UU.) para la adquisición y procesamiento de los espectros. Se utilizó una columna de sílice de alta resistencia (High Strength Silica), modelo Acquity UPLC HSS C18 Acquity (Waters, EE.UU.) (100 x 2,1 mm y un tamaño de partícula de 1,8 μm) como fase estacionaria. La fase móvil constaba de un componente A: 0,2% de ácido trifluoroacético (TFA) de grado espectrofotométrico $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en agua Milli-Q® y un componente B: acetonitrilo de grado HPLC (Panreac, España) con 0,2% de TFA.

A continuación se detallan las condiciones de elución empleadas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Condiciones de elución de los ácidos hidroxibenzóicos y flavanoles

| Tiempo (min) | C.A. (%) | C.B. (%) |
|--------------|----------|----------|
| 0 | 100 | 0 |
| 0,5 | 98 | 2 |
| 2 | 92 | 8 |
| 8 | 85 | 15 |
| 15 | 77 | 23 |
| 18 | 0 | 100 |
| 20 | 100 | 0 |
| 25 | 100 | 0 |

- Volumen de inyección: 5 μ L
- Flujo: 0,4 mL/min
- Temperatura de la columna: 45°C.
- Detector de ultravioleta- haz de fotodiodos (UV-PAD): se utilizó un intervalo de barrido de 190 a 500 nm, y una longitud de onda específica de 277 nm para la identificación de los ácidos hidroxibenzóicos y flavanoles.

La cuantificación de los picos obtenidos se realizó mediante una recta de calibrado con patrón externo de los siguientes compuestos: ácidos gálico, siríngico y vainílico (Extrasynthèse, Francia), catequina y epicatequina (Chromadex, EE.UU.). Los resultados se expresaron en mg de compuesto/L de extracto.

Ácidos hidroxicinámicos

Para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos se utilizó un método basado en el descrito por Samanidou y col., 2001); previamente se separaron los ácidos de la muestra mediante una extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction) con Strata-X (Phenomenex, EE.UU.) siguiendo el protocolo que a continuación se describe: como paso previo a la carga de la columna con la muestra ésta se acondicionó con metanol, seguido de un lavado con agua. A continuación, se cargó la muestra, seguido de un lavado con agua, y se procedió a la elución de los compuestos de interés con un 10% de metanol en agua. La medida cromatográfica se realizó con un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC) modelo Alliance

2690 (Waters, EE.UU.). La adquisición y procesamiento de los espectros se llevó a cabo con el sistema Empower Pro® (Waters, EE.UU.). Se utilizó una columna Zorbax SB-C18 3,5 µm (4,6 x 75 mm) (Agilent, EE.UU.) como fase estacionaria. El gradiente de elución empleado se detalla a continuación, en el cual el componente A estaba formado por ácido fórmico (Panreac, España) al 0,2% en agua Milli-Q y el componente B por 0.2% de ácido fórmico en metanol grado HPLC (Panreac, España).

A continuación se detallan las condiciones de elución empleadas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Condiciones de elución de los ácidos hidroxicinámicos.

| Tiempo (min) | C.A.(%) | C.B.(%) |
|--------------|---------|---------|
| 0 | 98 | 2 |
| 15 | 70 | 30 |
| 25 | 50 | 50 |
| 26 | 0 | 100 |
| 27 | 0 | 100 |
| 28 | 98 | 2 |
| 33 | 98 | 2 |

- Volumen de inyección: 15 µL
- Flujo: 1,8 mL/min
- Temperatura de la columna: 45°C.
- Detector de ultravioleta- haz de fotodiodos (UV-PAD): se utilizó un intervalo de barrido de 200 a 500 nm, y una longitud de onda específica de 277 nm para la identificación del ácido *cis/trans*-p-cumárico y de 313 nm para los ácidos *trans*-caféico y ferúlico.

La cuantificación de los picos obtenidos se realizó mediante una recta de calibrado con patrón externo de los siguientes ácidos: *cis*-p-cumárico, *trans*-caféico y ferúlico (Extrasynthèse, Francia). Los resultados se expresaron en mg de compuesto/L de extracto.

Estilbenos

El método cromatográfico se basó en el empleado por Poussier y col., 2003) para lo cual se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC) modelo

Alliance 2690 (Waters, EE.UU.), dotado de detectores de PAD y de fluorescencia (modelo 474, Waters, EE.UU.). La adquisición y procesamiento de los espectros se llevó a cabo con el sistema Empower Pro® (Waters, EE.UU.). Se utilizó la columna Lichrospher 250-4 RP18, 5 µm (4.6 x 250 mm) (Merck, Alemania), junto con una precolumna Lichrocart 4-4 Lichrospher 100 RP18 (Merck, Alemania). La fase móvil se compuso de un componente A formado por agua y un componente B, por acetonitrilo de grado HPLC (Panreac, España).

Se utilizaron las siguientes condiciones de elución (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Condiciones de elución de los estilbenos.

| Tiempo (min) | C.A. (%) | C.B. (%) |
|--------------|----------|----------|
| 0 | 90 | 10 |
| 23 | 15 | 85 |
| 35 | 90 | 10 |
| 40 | 90 | 10 |

- Volumen de inyección: 20 µL
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura de la columna: 25°C.
- Detector de ultravioleta- haz de fotodiodos (UV-PAD): se utilizó un intervalo de barrido de 200 a 400 nm, y una longitud de onda específica de 308 nm para la identificación del *trans*-piceído y *trans*-resveratrol; en fluorescencia se utilizó a una longitud de emisión de 374 nm y de excitación de 330 nm para la identificación del *cis*-piceído y *cis*-resveratrol.

La cuantificación los picos obtenidos se realizó mediante una recta de calibrado con patrón externo de los siguientes compuestos: *trans*-resveratrol (Sigma, EE.UU) y piceídos (Chromadex, EE.UU.). Asimismo, el patrón de *cis*-resveratrol se obtuvo del patrón de *trans*-resveratrol después de exponerlo a la luz ultravioleta (340 nm) durante 1 h. Los isómeros piceídos se identificaron por comparación con el espectro de la aglicona. Los resultados se expresaron en mg de compuesto/L de extracto.

Antocianos y flavonoles por UPLC

Para el análisis de antocianos y flavonoles se utilizó un método cromatográfico basado en el descrito por Otteneder y col., 2004) adaptado a un cromatógrafo de líquidos de ultra eficacia (UPLC) modelo Acquity (Waters, EE.UU.). La adquisición y procesamiento de los espectros se llevó a cabo con el sistema Empower Pro® (Waters, EE.UU.). Se utilizó la columna Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (2.1x100 mm) (Waters, EE.UU.) como fase estacionaria. La fase móvil se compuso de un componente A (3% de acetonitrilo de grado HPLC (Panreac, España) y 10% de ácido fórmico 98-100% (Merck, Alemania), y un componente B (50% de acetonitrilo y 10% de ácido fórmico) siguiendo el siguiente gradiente (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Condiciones de elución de los antocianos y flavonoles.

| Tiempo (min) | C.A. (%) | C.B. (%) |
|--------------|----------|----------|
| 0 | 94 | 6 |
| 15 | 70 | 30 |
| 30 | 50 | 50 |
| 35 | 40 | 60 |
| 41 | 94 | 6 |
| 46 | 94 | 6 |

- Volumen de inyección: 5 μL
- Flujo: 0,6 mL/min
- Temperatura de la columna: 50°C.
- Detector de ultravioleta- haz de fotodiodos (UV-PAD): se utilizó un intervalo de barrido de 200 a 500 nm, y una longitud de onda específica de 500 nm para la identificación de los antocianos glucosidados y a 250 nm para los flavonoles.

La cuantificación los picos obtenidos se realizó mediante una recta de calibrado con patrón externo de los siguientes compuestos: 3-O-glucósido de malvidina, 3-O-glucósido de cianidina, 3-O-glucósido de delphinidina, 3-O-glucósido de peonidina y 3-O-glucósido de petunidina, como antocianos glucosidados, y 3-O-glucósido de quercetina, 3-O-galactósido de quercetina, taxifolina, 3-galactósido de

miricetina y rutina, como flavonoles (Chromadex, EE.UU.). Los resultados se expresaron en mg de compuesto/L de extracto.

3.2. Estudio de biodisponibilidad in vitro

3.2.1. Simulación del proceso digestivo

Los extractos sólido-líquido obtenidos a partir de hollejo que presentaban las características más interesantes se sometieron a un proceso de digestión in vitro basado en el método descrito por Miller y col., 1981) que se describe a continuación.

Se mezcló el extracto (150 mg) con 10 mL de saliva humana obtenida de voluntarios y 10 mL de agua, homogeneizándose la mezcla durante 5 minutos en un mortero (fase de masticación). Posteriormente, las muestras masticadas se diluyeron con 100 mL de agua y se disminuyó el pH a 2 mediante la adición de HCl 6M. Una vez ajustado el pH, se añadió una solución de pepsina porcina (0,5 g de pepsina (Sigma-Aldrich, EE.UU.)/100 g de homogeneizado, pepsina disuelta en 5 mL de HCl 0,1 M), dejándose incubar durante 2 h a 37°C con una agitación orbital de 60 rpm (fase estomacal). A continuación, se añadieron 20 mL de solución pancreática (0,08 g de pancreatina de porcino (Sigma-Aldrich, EE.UU.) + 0,5 g de sales biliares (Sigma-Aldrich, EE.UU.)/en 20 mL de NaHCO₃ 0,1 M) y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 0,5 M. Posteriormente, la mezcla digerida se estabilizó con NaHCO₃, mediante el siguiente cálculo:

$$\text{g de NaHCO}_3 = \text{mL de NaOH 0,5 M gastados} \times 0,168$$

Después de un periodo de incubación de 30 min con una agitación orbital de 60 rpm, se añadieron otros 20 mL de la solución pancreática y se incubó la mezcla durante 2 h a 37°C con una agitación orbital de 60 rpm (fase intestinal).

Se tomaron alícuotas en todas las fases del proceso digestivo: inicial, fase de masticación, fase estomacal y fase intestinal para la evaluación de la variación de la actividad antioxidante a lo largo del proceso digestivo.

3.2.2. Simulación de la absorción a través del epitelio intestinal

La determinación de la absorción intestinal se llevó a cabo mediante el empleo de la línea celular Caco-2 (Invitrogen, España) procedente de adenocarcinoma de colon humano. Las células se mantienen en el medio de Eagle's

modificado Dubelcco's (DMEM) con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de hepes, un 1% de aminoácidos no esenciales y un 1% de glutamina.

La determinación de la dosis máxima utilizable de los productos a ensayar para no causar toxicidad en el modelo celular Caco-2 se llevó a cabo de manera similar al protocolo detallado para el modelo celular THP-1 (apartado 3.1.3 de la memoria).

Para llevar a cabo los ensayos de absorción se utilizaron células Caco-2 entre los pases 30 y 45, cultivadas en placas especiales de 12 pocillos Transwell™ Costar® (Corning, EE.UU.). Dichas placas constan de un cestillo interior, con una membrana semipermeable de poliéster en el fondo, dentro de un pocillo de mayor volumen, simulando la zona apical y basolateral de las monocapas de enterocitos intestinales cuando las células Caco-2 recubren por completo la superficie de la membrana (Figura 3.3).

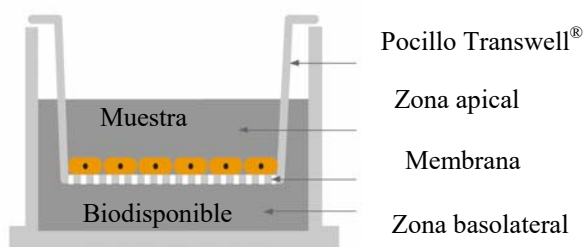


Figura 3.3. Disposición de la monocapa de células Caco-2 en los estudios de absorción intestinal (adaptado de Ramirez, 2009).

Las células se sembraron con una densidad de 105 células/cm² sobre la membrana contenida en el soporte de cada pocillo (tamaño de poro 0,4 µm, 12 mm de diámetro, 1,1 cm² de superficie de crecimiento), añadiéndose medio de cultivo tanto en la zona apical (750 µL) como en la basolateral (1,5 mL). El medio de cultivo se reemplazó cada 2 días y se permitió que las células Caco-2 crecieran sobre la membrana formando una monocapa (cubriendo toda la superficie) y que posteriormente se diferenciaran formando el borde de cepillo característico de los enterocitos intestinales. Todo este proceso tuvo una duración aproximada de 21 días.

Como paso previo a la realización de los estudios de absorción se evaluó la integridad de la monocapa de células midiendo el potencial transmembrana (TEER) mediante un voltímetro Evon (World Precision Instruments, EE.UU.). Los ensayos de absorción se realizaron cuando la medida del TEER fue superior a $250 \Omega/\text{cm}^2$. Una vez comprobada la integridad de la membrana celular y la diferenciación celular, se añadieron a la zona apical del pocillo una concentración determinada no tóxica del sobrenadante obtenido tras la digestión intestinal disuelto en 750 μL de medio de cultivo, y en la zona basolateral se añadió 1 mL de medio de cultivo. Estas placas se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante 3 h y se procedió a la recuperación del medio de cultivo tanto de la zona apical como basolateral para su posterior análisis.

3.3. Estudio en animales

3.3.1. Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar machos adultos (200-250 g). Los animales recibieron en el agua de bebida el extracto de hollejos procedente de uva blanca (GB2) en cantidad equivalente a la de un consumo de etanol moderado para el hombre (300 mL/día de una bebida con un 13% de alcohol y considerando un peso corporal de 70 kg), lo que corresponde a 1,07 mL/animal·día. Los biberones se prepararon a diario y los animales tuvieron libre acceso a la bebida. Durante la primera semana se valoró diariamente la ingesta líquida de la unidad experimental (jaula) para verificar si se produjo un incremento o descenso de la misma.

Para preparar las distintas bebidas, se tomó como solución de partida una solución azucarada (5,9 g/L) a la que se añadieron las distintas concentraciones del extracto (7 y 14 mmol trolox/L) y, en su caso, etanol.

Las variables a tener en cuenta a lo largo del estudio fueron las siguientes:

- Concentración de extracto
- Concentración de etanol

De esta manera, se plantearon cuatro grupos de ensayo diferentes:

1. Grupo Control (GC): Se suministró a los animales agua con azúcar.
2. Grupo con administración del extracto 7 mmol trolox/L (7 eq T): Se suministró agua con azúcar más el extracto.

3. Grupo con administración del extracto 14 mmol trolox/L(14 eq T): Se suministró agua con azúcar más el extracto.
4. Grupo con administración del extracto 14 mmol trolox/L y con alcohol (14 eq T EtOH): Se suministró agua con azúcar más el extracto y alcohol. Para el suministro de alcohol se siguieron las recomendaciones de ingesta diarias para adultos sanos (30 g/día para 70 kg de peso) (Saremi y col., 2008).

Se asignaron 8 animales por grupo por lo que se requirieron 32 ratas en total. El tratamiento tuvo una duración final de 12 semanas. Durante todo ese tiempo los animales recibieron, de forma simultánea a la administración de las distintas bebidas funcionales, una dieta enriquecida de colesterol (2%) *ad libitum*. Se pesó a los animales al inicio del estudio y una vez cada dos semanas durante las 12 semanas que duró el estudio.

3.3.1.1. Obtención de muestras

Una vez finalizado el estudio se procedió al sacrificio del animal por exsanguinación mediante punción intracardiaca y posterior administración de KCl (1M) bajo anestesia inhalatoria con isoflurano Forane[®] (Arkema, France) al 2%. Se recogieron las siguientes muestras:

- Muestra de sangre: La sangre se recogió mediante punción intracardiaca y se transfirió a tubos con EDTA y Gelatina (bioquímica) (6 mL). Se procedió a su centrifugado (4.000 rpm durante 10 min) para la obtención del plasma y suero.
- Muestras de tejido: obtenida la muestra de sangre se procedió a la apertura de la cavidad torácica para proceder a la disección de la aorta y su extracción junto con el corazón. Posteriormente se procedió a la sección de la aorta desde la válvula tricúspide. Se recogió y pesó la grasa retroperitoneal, el hígado y el riñón (derecho). Todos los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador -80°C hasta su posterior procesamiento.

3.3.1.2. Parámetros analizados

En las muestras de suero y plasma obtenidas tras el sacrificio de los animales se determinaron los siguientes parámetros:

Perfil lipídico

Las concentraciones en plasma de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas HDL, y LDL fueron determinadas por métodos enzimáticos utilizando un auto-analizador (Hitachi, España). Las concentraciones de ácidos grasos libres fueron analizadas mediante el Kit de Roche 11383175001, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de la proteína C reactiva y daño celular

Las concentraciones en suero/o plasma de la proteína C reactiva se analizaron mediante ELISA (Alpha Diagnostic International, EE.UU.). El contenido en enzimas hepáticas y bilirrubina se analizó utilizando un auto-analizador (Hitachi, España).

Determinación de la peroxidación lipídica

Se llevó a cabo el análisis del estado antioxidante de muestras de tejidos, así como de plasma, mediante la determinación de la peroxidación lipídica. Para ello, se tomaron 25 mg de tejido o muestras de plasma. Los peróxidos de lípidos, procedentes de los ácidos grasos poliinsaturados son inestables y se descomponen dando lugar a una serie de compuestos entre los cuales se incluyen los compuestos carbonilo reactivos como el malondialdehído (MDA). El MDA generado se cuantifica mediante reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico (TBA), puesto que en medio ácido y a altas temperaturas (95°C) da lugar a aductos de color rosa, conocidos como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, detectables colorimétricamente a 530-540 nm. Para la determinación del TBARS se homogeneizaron los 25 mg de tejido o se tomaron muestras de plasma procesándose a continuación según las instrucciones del fabricante con un kit TBARS con referencia 10009055. (Cayman Chemical, USA). Los resultados se expresan como μM de MDA, mediante el uso de una curva de calibrado de TEP (tetraetoxipropano) cuya hidrólisis en medio ácido da lugar a dos moléculas de MDA por cada molécula de TEP.

Determinación de óxido nítrico en aorta y corazón

La concentración de nitrito y nitrato, metabolitos de óxido nítrico, en tejidos de aorta y corazón se determinó por el método de la reacción de Griess modificado, usando un ensayo en kit colorimétrico de nitrato/nitrito de Cayman (número de catálogo 780001). Las muestras de tejido separadas fueron homogenizadas en PBS a

un sonicador a baja temperatura (17 micrones, 3 aplicaciones de 10 segundos en intervalos de 30 segundos) y el sobrenadante se incubó, durante 40 minutos a temperatura ambiente, en una mezcla de una solución de NADPH (1M) y nitrato reductasa, convirtiéndose el nitrato a nitrito. Luego, las muestras con nitritos fueron incubadas con el reactivo de Griess durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placa (Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA) y los resultados se expresaron en mmoles de nitrito más nitrato/mg de proteína, usando nitrito para construir la curva de calibración. Actividad enzimática Óxido Nítrico Sintetasa (NOS)

La actividad de la enzima NOS se determinó en los homogenizados de tejido arterial y cardíaco mediante técnicas fluorimétricas usando kits comerciales (Cayman Chemical, USA) acorde a las instrucciones del fabricante. La actividad NOS se determina cuantificando la conversión de arginina en citrulina siendo el método estándar empleado para determinarla.

Determinación de la expresión génica de iNOS por PCR cuantitativa.

Para la determinación de la expresión génica de iNOS se realizó en primer lugar un homogenizado de la muestra de tejido de aorta en presencia de Trizol con el fin de aislar el contenido en mRNA. Se sintetizó el correspondiente cDNA mediante el kit de retrotranscriptasa (Invitrogen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de iNOS fue determinada mediante PCR cuantitativa en un termociclador Roche mediante el kit Sybgreen y los capilares que provee la compañía. Los cebadores fueron diseñados específicamente. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen constitutivo S26.

3.4. Estudio toxicológico

3.4.1. Diseño del estudio

Como paso previo al estudio clínico se evaluó la posible toxicidad de los extractos de compuestos fenólicos utilizados en el mismo mediante el empleo del test nº 420 de la OCDE (OCDE, 2002) (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2004). Se utilizaron cinco ratas Wistar machos adultos (200-250 g) a las que se les administró, por vía oral, una única dosis de 10 mL de extracto por kg de peso, seguido de un periodo de observación de 14 días. Como paso previo a la

administración del extracto, únicamente se les permitió a los animales la ingesta de agua durante toda la noche. Transcurridas tres horas después de la ingesta del extracto se procedió a restablecer nuevamente la alimentación habitual de los animales.

La dosis de extracto empleada correspondió a la dosis máxima que el test n°420 de la OCDE recomienda para una disolución no-acuosa (OCDE, 2002).

3.4.2. Parámetros analizados

Tras la ingesta del extracto se analizaron los siguientes parámetros clínicos:

- Apariencia general
- Nivel de consciencia
- Postura y forma de andar
- Apariencia de la piel/pelo
- Estado de hidratación
- Apariencia de los ojos/orejas/nariz/cuello
- Indicadores de perfusión (membranas de la mucosa)
- Apariencia de los nódulos linfáticos
- Tasa de respiración
- Palpación abdominal

Asimismo, se controló la existencia de fallecimientos entre los animales. Dichos parámetros se midieron a los 30 minutos, 2 horas y 4 horas durante el primer día, y una vez al día en los días posteriores. Además, se determinó el peso corporal de los animales antes de la administración y semanalmente después de ella.

Al final del periodo de observación, se procedió a la muerte de los animales mediante la aplicación de una atmósfera de CO₂, seguido de un análisis histológico.

3.4.3. Interpretación de los resultados

Se clasifica los extractos según el Sistema de Clasificación Globalmente Armonizado por Sustancias Químicas y Mezclas (GHS) con el siguiente esquema:

| Mortalidad relativa al producto probado | Categoría GHS |
|---|----------------|
| ≥ 2 animales muertos (de 5) | No clasificado |
| ≥ 1 animal muerto y/o con evidencia de | 5 |

| | |
|-----------------------|---------------------|
| toxicidad (de 5) | |
| Ninguno muerto (de 5) | 5/sin clasificación |

3.5. Estudio clínico

3.5.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio clínico-nutricional de intervención en agudo y a corto plazo para evaluar las propiedades antioxidantes y la biodisponibilidad del extracto obtenido a partir de hollejos de uva tinta (MT3), para lo cual se realizó un ensayo clínico prospectivo aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo de 6 semanas de duración (2 fases de intervención de 2 semanas cada una, más 1 semana de lavado previa a cada intervención). De esta manera los productos del estudio fueron los siguientes:

- Bebida funcional (BF): bebida sin alcohol constituida por agua (1 L), un extracto de uva tinta (26 g) y sacarosa (10 g).
- Bebida placebo (BP): similar a la BF pero sin adición del extracto polifenólico, esto es, agua (1 L) más sacarosa (10 g).

En total, se reclutaron un total de 37 individuos, a través de la Unidad de Nutrición Clínica y Dietética del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Los sujetos incluidos en el estudio cumplieron todos y cada uno de los siguientes criterios: hombres y mujeres con edad comprendida entre 25 y 55 años; adecuado nivel cultural y de comprensión del estudio clínico; ausencia de un entorno familiar o social que impida el cumplimiento del tratamiento dietético; estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y que den su consentimiento informado por escrito. Mientras que se aplicaron los siguientes criterios de exclusión a los sujetos: diagnóstico de Diabetes Mellitus; dislipemia bajo tratamiento farmacológico; hipertensión arterial bajo tratamiento farmacológico; sujetos fumadores; consumo elevado de alcohol; Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30; consumo de medicamentos, suplementos de vitaminas, minerales o prebióticos que interfieran con la respuesta del organismo a los compuestos fenólicos en las 2 semanas previas al inicio del estudio; demencia, enfermedad mental o disminución de la función cognitiva; realización de algún tipo de dieta especial por enfermedad asociada como enfermedad celíaca, insuficiencia renal crónica, etc.;

mujeres con terapia hormonal sustitutiva; tratamiento psicofarmacológico; tratamiento con fármacos que necesiten ser monitorizados como digoxina, acenocumarol, warfarina, etc.; rechazo de los alimentos incluidos en el desayuno estándar; rechazo para mantener una dieta baja en compuestos fenólicos durante las 6 semanas que dura el estudio; tratamiento de al menos los 2 meses precedentes con fármacos que modifiquen perfil lipídico (por ejemplo estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides...); mujeres embarazadas o en período de lactancia; actividad física intensa; cualquier otro criterio de exclusión que el investigador principal del estudio haya considerado relevante.

Cada grupo de intervención realizó dos fases experimentales de 14 días de duración, con un periodo de lavado previo a cada una de ellas de 7 días.

Los 14 días de cada fase experimental estuvieron divididos en 1 estudio agudo (día 1) y en un estudio a corto plazo (+13 días).

Cada grupo recibió el producto de estudio en orden diferente en cada fase experimental:

- Grupo A/B: Tras 7 días con dieta de lavado, los participantes consumieron 187 mL de BF junto con un desayuno estándar el primer día de la fase 1 (estudio agudo). Ese mismo día tomaron una dosis de 187 mL de BF con la cena. Y los días que restan hasta completar los 14 consumirán 187 mL en la comida y 187 mL en la cena de BF (intervención a corto plazo). Tras una semana de lavado sin consumir ningún producto, los participantes consumieron 187 mL de BP junto con un desayuno estándar el primer día de la fase 2 (estudio agudo). Ese mismo día tomaron una dosis de 187 mL de BP con la cena. Y los días que restaban hasta completar los 14 consumieron 187 mL en la comida y 187 mL en la cena de BP (intervención a corto plazo).
- Grupo B/A: Tras 7 días con dieta de lavado, los participantes consumieron 187 mL de BP junto con un desayuno estándar el primer día de la fase 1 (estudio agudo). Ese mismo día tomaron una dosis de 187 mL de BP con la cena. Y los días que restaban hasta completar los 14 consumieron 187 mL en la comida y 187 mL en la cena de BP (intervención a corto plazo). Tras una semana de lavado sin consumir ningún producto, los participantes

consumieron 187 mL de BF junto con un desayuno estándar el primer día de la fase 2 (estudio agudo). Ese mismo día tomaron una dosis de 187 mL de BF con la cena. Y los días que restaban hasta completar los 14 consumieron 187 mL en la comida y 187 mL en la cena de BF (intervención a corto plazo).

Se asignaron las letras A/B a cada uno de los productos (Producto en investigación o placebo) para ser entregados a los participantes en orden aleatorio sin que ellos ni el investigador fueran conocedores de cuál es cada uno garantizando así el carácter doble ciego del diseño del estudio.

Se consideró que cada individuo cumplió el tratamiento cuando se documentó una ingesta de los productos $\geq 90\%$ del pactado.

De los 37 individuos que comenzaron el estudio, lo finalizaron 26 (13 pertenecientes al grupo A/B y 13 al B/A) los cuales fueron evaluados al inicio y al final de cada fase de intervención (15 días).

El procedimiento de aleatorización se llevó a cabo empleando un sistema validado SMSS que asignó aleatoriamente y de forma automática los grupos de tratamiento a los números de aleatorización, y que fue proporcionado por la Unidad de Bioestadística del Hospital La Paz de Madrid. Los datos de aleatorización y enmascaramiento fueron estrictamente confidenciales. Una vez completado el estudio, verificado el archivo de datos y determinada cualquier violación del protocolo, se procedió a la apertura de códigos para proceder al análisis de los datos.

Tanto el producto de investigación (BF) como el producto placebo (BP) fueron consumidos vía oral, dentro del contexto de la dieta habitual pero sin consumir alimentos ricos en polifenoles que pudieran interferir con la bebida objeto de estudio durante las 6 semanas (dieta de lavado). Para ello se les entregó una guía dietética con las restricciones a tener en cuenta (Tabla 3.6)

Tabla 3.6. Descripción de las restricciones de consumo de alimentos ricos en polifenoles durante el estudio

| Durante los 35 días que dura el estudio usted deberá mantener su dieta habitual pero deberá tener en cuenta las siguientes consideraciones | | |
|--|--|---|
| | Alimentos prohibidos | Alimentos restringidos |
| Frutas | Manzanas Uvas Fresas Naranjas Cerezas Ciruelas Frambuesas Arándanos Moras Grosellas | |
| Verduras | Cebollas Brócoli Tomates Espinacas Alcachofas | |
| Frutos secos | Nueces Almendras | |
| Bebidas | Te Vino tinto Zumo natural de naranja Zumos naturales de otras frutas Zumo de Tomate | Café. (máx 2 taza al día) Cerveza (máx 3 cañas/semana) Zumos de frutas en botella o enlatados (máx 1/día) |
| Otros | Chocolate Cacao | Aceite oliva (máx. 4 cucharadas soperas) |
| Si consume alguno de los alimentos incluidos en esta Tabla deberá ser anotado en el cuaderno de registro que le ha sido entregado para tal efecto. | | |

En la Tabla 3.7 se describen, cronológicamente, los estudios de intervención realizados (agudo y a corto plazo), detallando los parámetros determinados y la terminología empleada respecto a los días de toma de muestra. Asimismo, se muestra el cronograma de visitas de ambos estudios, con la consiguiente metodología aplicada en cada una de ella.

Tabla 3.7. Cronograma de intervención (días) del estudio clínico (agudo y a corto plazo) con los parámetros analizados.

| | | lavado | FASE 1 | | | | | | | | | | lavado | FASE 2 | | | | | | | | | |
|---|-------------|----------|--------|---|---|---|---|---|---|-------------|-----------------|-----------|---------|--------|---|---|---|---|---|-----------|-------------|--|--|
| | | | agudo | | | | | | | corto plazo | | | | agudo | | | | | | | corto plazo | | |
| Días | --6 (V0) | -6- 0 | 1 (V1) | | | | | | | 22 13 | - 14 (V2) | 15- 21 | 22 (V3) | | | | | | | 23- 34 | 35 (V4) | | |
| Nº Extracción | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | |
| Selección y entrada del estudio | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Criterio de inclusión/exclusión | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Consentimiento informado | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aleatorización | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Estudio dietético | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Estudio actividad física | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Instrucciones de seguimiento de dieta de lavado | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Antropometría | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tensión arterial y frecuencia cardíaca | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Seguimiento de dieta de lavado | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | lavado | FASE 1 | | | | | | | | | | lavado | FASE 2 | | | | | | | | | |
|--|-------------|--------|--------|---|---|---|---|---|---|-------------|---|------------|--------|---------|---|---|---|---|---|--|-------------|------------|--|
| | | | agudo | | | | | | | corto plazo | | | | agudo | | | | | | | corto plazo | | |
| Días | --6 (V0) | -6-0 | 1 (V1) | | | | | | | 22 13 | - | 14 (V2) | 15-21 | 22 (V3) | | | | | | | 23-34 | 35 (V4) | |
| Nº Extracción | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | |
| Marcadores del metabolismo de la glucosa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Marcadores del perfil lipídico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Marcadores antioxidantes/inflamación | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sensación de saciedad/hambre | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Adherencia y tolerancia | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Percepción sensorial | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Entrega de material | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Como paso previo a ambos estudios se examinó y entrevistó a los sujetos con el fin de seleccionarlos aplicando los criterios de inclusión/exclusión anteriormente expuestos. De esta manera se recogieron datos sobre la historia clínica, patologías asociadas y medicación concomitante.

Asimismo, de los sujetos seleccionados se realizó una medida de sus constantes vitales; medidas antropométricas; su frecuencia de consumo de alimentos en el último año; patrón de actividad física, mediante cuestionario validado; y bioquímica base en sangre. A efectos de cómputo se consideró a esta visita como la Visita 0 (V0) del estudio (día -6 del estudio).

En esta primera visita, se les instruyó para llevar a cabo, durante los siete días previos al comienzo del estudio, una dieta con bajo contenido en compuestos fenólicos (dieta de lavado). Además se les entregó un cuaderno de registro donde debían anotar los alimentos que consumieran fuera de la dieta marcada.

El día 1 del estudio (Visita 1 (V1)) se procedió a adjudicar el n° de aleatorización para ser distribuido en los grupos experimentales (A/B o B/A). Asimismo, se recogió el recipiente de orina de 24 h del día anterior; posteriormente se llevó a cabo la preparación de las alícuotas correspondientes para la determinación de metabolitos indicadores de biodisponibilidad de compuestos fenólicos y de marcadores de oxidación.

3.5.1.1 Ensayo agudo

El primer ensayo en agudo se llevó a cabo en la Visita 1 (día 1, Fase 1). Cada sujeto acudió en ayuno de 12 h al centro. En la Tabla 3.8 se refleja el cronograma de los parámetros medidos: extracción sanguínea, presión arterial y cuestionario de evaluación sobre la sensación de saciedad y hambre. Asimismo, se refleja cronológicamente la ingesta de la bebida junto con una dieta estándar. La recogida de orina se produjo a lo largo de todo el tiempo de ensayo.

A tiempo cero cada sujeto consumió la bebida adjudicada (187 mL de BF o BP) junto con una dieta estándar. A partir de ese momento se recogió toda la orina de cada paciente hasta la finalización del ensayo agudo.

Asimismo, a lo largo del ensayo se realizó un estudio nutricional completo de los 7 días previos (registro alimentario habitual de 3 días, frecuencia de consumo alimentario y cuestionario de registro de desvío de dieta de lavado). También se revisó el cuestionario de actividad física mediante un cuestionario, lo que permitió calcular el coeficiente de actividad individual de cada paciente. Además, se tomaron las medidas antropométricas, anteriormente citadas, de cada sujeto.

Tabla 3.8. Cronograma del ensayo en agudo con los parámetros evaluados (minutos).

| Tiempo (min) | -30 | 0 | 30 | 60 | 120 | 180 | 240 |
|------------------------|-----|---|----|----|-----|-----|-----|
| Hemograma básico | | | | | | | |
| Metabolismo glucosa | | | | | | | |
| Perfil lipídico | | | | | | | |
| Marcadores Oxidación | | | | | | | |
| Marcadores inflamación | | | | | | | |

Las determinaciones analíticas en plasma que se llevaron a cabo en los diferentes tiempos fueron las siguientes: hemograma básico, metabolismo de la glucosa, perfil lipídico, marcadores de oxidación, marcadores de inflamación.

En el ensayo en agudo de la Fase 2 (V3, día 22) se repitió el mismo protocolo de la Visita 1, pero teniendo en cuenta que en esta visita cada sujeto consumió la bebida que no tomó en la Fase 1.

3.5.1.2. Ensayo a corto plazo

El primer ensayo a corto plazo fue llevado a cabo durante los días 2-13 y evaluado el día 14 (V 2). De esta manera, tras finalizar el ensayo en agudo, cada sujeto fue de nuevo instruido para llevar a cabo durante dos semanas una dieta con bajo contenido en compuestos fenólicos que debía acompañar con 394 mL de la bebida adjudicada (187 mL comida + 187 mL cena).

Tras las 2 semanas de intervención de la 1ª fase experimental cada sujeto acudió en ayuno de 12 h al centro para la realización de una extracción sanguínea. Asimismo, se recogió el recipiente de orina de 24h del día anterior. Además se tomaron los siguientes datos:

- Presión arterial.
- Estudio nutricional completo de los 7 días previos.
- Patrón de actividad física mediante un cuestionario de actividad física.
- Medidas antropométricas

Por último, los sujetos fueron de nuevo instruidos para llevar a cabo durante 7 días una dieta con bajo contenido en polifenoles (dieta de lavado) (días 15-21).

En el ensayo a corto plazo de la Fase 2 (V4, día 35) se repitió el mismo protocolo de la Visita 2, pero teniendo en cuenta que cada sujeto consumió durante las dos semanas previas la bebida que no tomó en la Fase 1.

3.5.2. Parámetros analizados

3.5.2.1. Constantes vitales

En todas las visitas, se midieron la tensión arterial (TA), tanto sistólica como diastólica, y la frecuencia cardiaca (FC) (pulsaciones/minuto). En concreto en la V1

y V3, durante el estudio en agudo, la presión arterial fue evaluada a diferentes tiempos (-30, 0, 60, 120, 180, 240 min), tal y como se indica en la Tabla 3.8.

3.5.2.2. Medidas antropométricas

Las medidas antropométricas realizadas fueron las siguientes: peso, altura, IMC, Circunferencia de la cintura (CCi) y porcentaje de grasa corporal. A continuación se describe cada una de estas medidas.

Peso corporal

Expresado en kilogramos, el peso corporal se mide mediante una báscula digital de uso clínico (capacidad 0 – 150 kg), con la persona posicionada de espaldas al visor, sin zapatos, con un mínimo de prendas de abrigo (pantalón y camiseta), talones juntos, mirada hacia frente y postura corporal recta.

Altura

La medición de la altura se hará mediante un tallímetro de precisión milimétrica, con la persona posicionada de espaldas al mismo, sin zapatos, talones juntos, mirada hacia frente y postura corporal recta.

Índice de Masa Corporal

El IMC se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IMC = \frac{\text{peso corporal}}{\text{altura}^2}$$

Donde el peso corporal se expresa en kilogramos y la altura en metros.

Circunferencia de la Cintura

Las últimas tendencias recomiendan utilizar la CCi para valorar el exceso de grasa ponderal, en vez de la circunferencia cintura/cadera, debido a la correlación positiva que tiene con el contenido abdominal de grasa. Los datos referidos a la circunferencia de la cintura de población española permiten estimar parámetros de riesgo cardiovascular a partir de 95 cm en varones y de 82 cm en mujeres, y riesgo muy elevado a partir de 102 cm en varones y 90 cm en mujeres.

La medida se toma en el punto más estrecho entre la última costilla y la cresta ilíaca, con la cinta pegada a la piel pero sin comprimir. Se debe mantener a la

persona en posición erguida, repartiendo el peso equitativamente en ambas piernas y sus brazos relajados a los costados del cuerpo.

Porcentaje de materia grasa corporal (% MG)

El porcentaje de grasa corporal se analizó por impedancia bioeléctrica (BIA). El BIA es un método para el estudio de la composición corporal que se basa en la naturaleza de la conducción de la corriente eléctrica a través de tejidos biológicos. Es rápido, portátil, no invasivo, barato y con poca dificultad técnica. También es seguro porque usa una frecuencia de 50 kHz que no son suficientes para estimular a los tejidos eléctricamente excitables. La corriente es imperceptible y no se han comunicado eventos desfavorables.

Este método mide la impedancia u oposición al flujo de una corriente eléctrica a través de los líquidos corporales contenidos fundamentalmente en los tejidos magro y graso. La impedancia es baja en el tejido magro, donde se encuentran principalmente los líquidos intracelulares y los electrólitos, y alta en el tejido graso. En la práctica, una pequeña corriente constante, típicamente de 800 μA a una frecuencia fija, usualmente 50 kHz, se pasa entre electrodos atravesando el cuerpo y la caída de voltaje entre los electrodos proporciona una medida de impedancia.

Las ecuaciones de predicción, generadas previamente correlacionando las medidas de impedancia contra una estimación independiente del agua corporal total, se usan posteriormente para convertir la impedancia medida en una estimación correspondiente del agua corporal total. La masa corporal magra se calcula entonces desde esta estimación usando una fracción de hidratación supuesta para el tejido magro. Y la masa grasa se calcula como la diferencia entre el peso corporal y la masa corporal magra.

En este estudio, para la medición de la grasa corporal mediante la técnica de la impedancia bioeléctrica se utiliza el analizador vectorial de impedancia EFG3 (ElectroFluidGraph).

Las condiciones impuestas a los pacientes para garantizar la fiabilidad de la medición se enumeran a continuación: posición de supino sobre superficie no conductora; miembros en abducción de 45°; temperatura de la habitación normal; ayuno de más de 2 horas; sin ejercicio vigoroso en las 24 horas previas; sin ingestión

de alcohol, café, refrescos con cafeína, chocolates en las 24 horas previas; no estar en el periodo menstrual, ni en los 3 días que anteceden lo mismo; no utilización de accesorios de metal (pendientes, cadenas, pulseras, etc.).

3.5.2.3. Hábitos Nutricionales

Para el conocimiento de los hábitos nutricionales y dietéticos de cada participante a lo largo del estudio, se aplicó: un registro de la frecuencia de consumo de alimento, junto con cuestionario dietético, anotando todos los alimentos ingeridos a lo largo del día, durante tres días. Estos datos proporcionaron información sobre la alimentación realizada por el participante y fueron evaluados cuantitativa y cualitativamente, clasificando la dieta en cuanto a diversidad y equilibrio siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC, 2004).

3.5.2.4. Patrón de actividad física

Para valorar el patrón de actividad física de cada sujeto a lo largo del estudio se empleó la versión corta del “Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ, en sus siglas inglesas)” validado en población española (USA Spanish version translated 3/2003 – short last 7 days self-administered version of the IPAQ – Revised August 2002). El cuestionario se divide en 4 categorías de preguntas en función del tipo de actividad del que se solicita información (vigorosa, moderada, caminar, sedentario). Los resultados nos proporcionaron información:

- Cuantitativa: se calculó la Tasa de Metabolismo Energético Total (MET) x minuto/semana para cada sujeto. Para ello, se debe tener en cuenta el tiempo dedicado a cada tipo de actividad, siendo para actividades vigorosas MET=8, para actividades moderadas MET=4 y para caminar MET=3.3). Una vez conocido esto se aplica la siguiente ecuación:

| |
|---|
| $\text{TOTAL MET-min/semana} = \text{MET actividad} \times \text{minutos de actividad/día} \times \text{días por semana}$ |
|---|

- Cualitativa: se clasificará el patrón de actividad física en 3 categorías en función de los resultados:
 1. Actividad Baja
 - No se registra actividad

- Se registra algo de actividad pero no lo suficiente para encuadrarlo dentro de las categorías 2 o 3

2. Actividad Moderada

- 3 o más días de actividad vigorosa al menos 20 min/día
- 5 o más días de actividad moderada y/o caminar al menos 30 min/día
- 5 o más días de cualquier combinación de caminar, actividad moderada o vigorosa
- TOTAL MET min/semana ≥ 600

3. Actividad Alta

- Actividad vigorosa al menos 3 días/semana y acumular por lo menos TOTAL MET min/semana ≥ 1500
- 7 o más de cualquier combinación de caminar, actividad moderada o vigorosa con un TOTAL MET min/semana ≥ 3000

3.5.2.5. Escala analógica visual para evaluar la motivación – saciedad al comer

En las V1 y V3 se evaluó la motivación-saciedad al comer para lo que se empleó una Escala analógica visual (VAS). En la

Figura 3.4 se refleja el cuestionario utilizado. El día del estudio en agudo se preparó a cada sujeto un desayuno estándar (yogur natural azucarado (125 g) + pan blanco (60 g) + queso semicurado (40 g)) que iba acompañado de la bebida adjudicada (A o B), de este modo se pretendía eliminar el efecto variable sobre la saciedad producida por otros componentes de la dieta o las formas de preparación de los alimentos.

El cuestionario se debía hacer de la siguiente manera:

- Justo antes de comer y, ya con el plato de comida enfrente, contestar a las 5 primeras preguntas de acuerdo con el deseo que se tuviera de comer, marcando con una rayita en la escala de 0 a 10.
- Justo después de comer, contestar las preguntas de 6 a 10, de acuerdo con el deseo que se siguiera teniendo de comer, marcando con una rayita en la escala de 0 a 10.

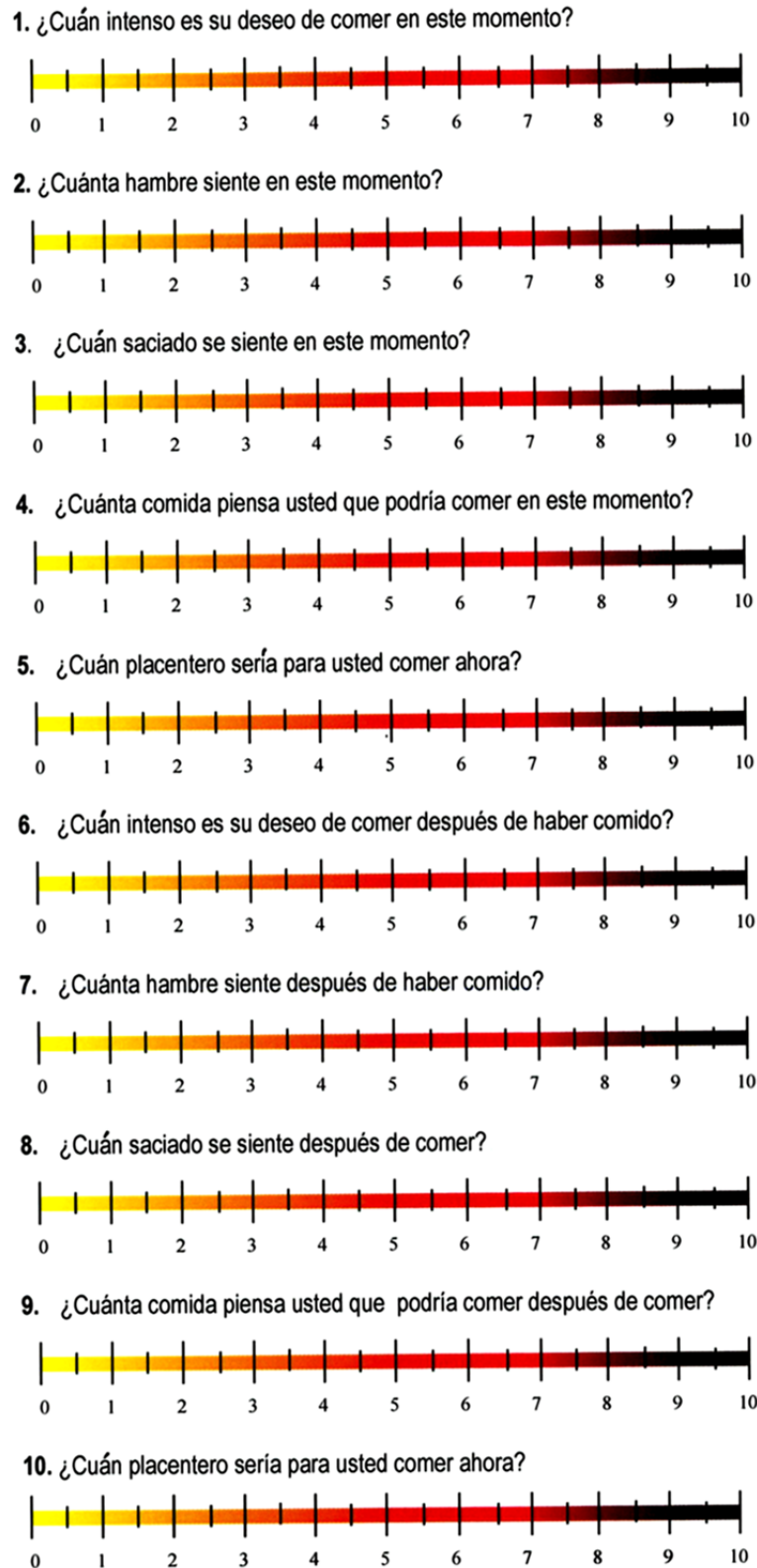


Figura 3.4: Cuestionario utilizado en la escala analógica visual para evaluar la motivación – saciedad al comer.

- Después de 60 y 90 minutos exactos tras haber empezado a comer, volver a contestar las preguntas de 6 a 10, de acuerdo con el deseo que se siguiera teniendo de comer, marcando con una rayita en la escala de 0 a 10.

3.5.2.6. Adherencia y tolerancia a los productos

En la visita final de cada fase de intervención, se evaluó la adherencia y tolerancia al uso del tratamiento adjudicado, comprobando el cumplimiento en el diario del consumo del producto y aplicando un cuestionario que pregunta al paciente si padece alguno de los siguientes síntomas: náuseas, acidez, diarrea, distensión abdominal y halitosis.

3.5.2.7. Percepción sensorial de los productos

En la visita final de cada fase de intervención se evaluó mediante un cuestionario la percepción sensorial gustativa y olfativa de los participantes por los productos.

3.5.2.8. Registro de acontecimientos adversos

Durante el transcurso de las visitas grupales y en la V2 se preguntó a cada sujeto de forma abierta sobre los cambios en su estado de salud desde la última visita. Para cada acontecimiento adverso, se registró la fecha de inicio, la intensidad, la relación con el producto del estudio, la medida adoptada y el desenlace.

3.5.2.9. Análisis sanguíneo

Como se ha comentado anteriormente, se llevó a cabo una extracción sanguínea en ayunas en las visitas V0, V2, y V4. Además, en la V1 y V3 se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos -30, 0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos considerando -30 min como el punto en ayunas y 0 min el momento inmediato a la ingesta del desayuno establecido + el producto asignado. Los parámetros bioquímicos evaluados en cada una de las visitas y tiempos descritos se analizaron por métodos no invasivos que permitieron valorar el estado nutricional, la glicemia del sujeto, su perfil lipídico, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación (estos dos últimos no se determinaron en la V0).

3.5.2.10. Estado nutricional

Se midieron varios indicadores del estado nutricional global y de la presencia de posibles déficits nutricionales, como son las proteínas plasmáticas (g/dL), el hematocrito (% de volumen de la sangre ocupado por los hematíes). Asimismo, se determinaron la urea y la creatinina sanguíneas (mg/dL), ya que un exceso de las mismas puede indicar una alteración de la función renal.

3.5.2.11. Glicemia

Se determinó la glucosa libre (mg/dL) y, como esta medida está muchas veces influenciada por la ingesta del día previo, se analizó también el porcentaje de hemoglobina glicosilada.

3.5.2.12. Perfil lipídico

Se determinaron algunos de los parámetros que han mostrado una relación más clara con la predisposición a sufrir enfermedades cardiovasculares, como son el colesterol total (mg/dL) (Col-T), el colesterol HDL (mg/dL) (HDL), el colesterol LDL (mg/dL) (LDL) y los triglicéridos totales (mg/dL) (TG).

3.5.2.13. Marcadores de estrés oxidativo

Como medida del estrés oxidativo a nivel plasmático se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: proteína C reactiva y daño celular; peroxidación lipídica; y actividad enzimática de la NOS. Los métodos empleados fueron similares a los ya descritos en el apartado 3.3.2. Asimismo, se determinó el contenido de vitamina E, porcentaje de LDL oxidada, selenio, urea y creatinina.

3.5.2.15. Marcadores de inflamación

Como medida de los procesos inflamatorios se llevó a cabo la determinación de fibrinógeno en plasma, y medida de TNF- α por ELISA. Asimismo se determinó la expresión de la expresión génica de iNOS por PCR cuantitativa, de manera similar a la ya descrita en el apartado 3.3.2.

3.5.2.16. Análisis de orina

En las muestras de orina en la V1 y V3 orina 24 h y en agudo hasta 4 horas y en la V2 y V4 orina 24 h, una vez preparadas las alícuotas, se determinaron los

marcadores de oxidación (peroxidación lipídica y creatinina) de manera similar a la descrita en el apartado anterior correspondiente al análisis sanguíneo.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1. Extractos de uva: actividad y composición

Con el objetivo de identificar las variedades de uva, tanto blanca como tinta, que presentaban estadísticamente una mayor actividad antioxidante, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para observar diferencias significativas con un post-hoc de Duncan ($p < 0,05$), marcándose con letras diferentes aquellas muestras que mostraban diferencias significativas.

Por otra parte, se utilizó el test de la t de Student ($p < 0,05$) en la comparación de los extractos acuosos y etanólicos dentro de una misma variedad, marcándose con un asterisco aquellas muestras en la que existían diferencias significativas.

El análisis de componentes principales (PCA) permitió estudiar la posible interrelación existente entre todas las variables estudiadas.

En todos los casos se empleó el programa Statistica versión 9 (Statsoft, EE.UU.) para los tratamientos de los datos.

3.6.2. Estudio con animales

El análisis estadístico del estudio con animales se llevó a cabo mediante el programa SPSS v. 11.5. Se realizaron estudios descriptivos simples de las variables analizadas. Las variables cuantitativas se compararon usando análisis no paramétricos (Mann–Whitney y Kruskal–Wallis) para muestras no relacionadas para $p < 0,05$.

3.6.3. Estudio Toxicológico

Para el análisis estadístico de los resultados del estudio toxicológico se utilizó el programa StatGraphics v. 5.0. Para determinar si existían diferencias significativas en el peso tras la ingesta de una dosis aguda de extracto a lo largo de las semanas de estudio se empleó el análisis de la t-Student, tomando un nivel de significación de $p < 0,05$.

3.6.4. Estudio clínico

Los datos del ensayo clínico fueron analizados con el programa estadístico SPSS 9.0 (SPSS Inc.). La descripción de los datos cualitativos se realizó en forma de frecuencias absolutas y porcentajes y los datos cuantitativos mediante media, mediana y desviación típica (mínimo, máximo) según fuera la distribución de los datos.

En la comparación de datos cuantitativos entre los dos grupos, se utilizó el test de la t-Student como prueba paramétrica y el test de la U de Mann-Whitney como prueba no paramétrica. Para comparar proporciones de datos cualitativos entre los dos grupos, se utilizó el test chi-cuadrado o test de Fisher según correspondiera.

Todos las pruebas estadísticas se consideraron bilaterales y como valores significativos, aquellos $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación y caracterización de los compuestos antioxidantes procedentes de variedades de uva.

La variedad de uva es uno de los principales parámetros que influyen en la actividad antioxidante de las uvas y sus derivados. De esta manera, con el fin de determinar las variedades de uva dotadas de una mayor capacidad antioxidante y alto contenido en compuestos fenólicos con las que obtener vinos con propiedades saludables, se llevaron a cabo, a partir de cada variedad de uva, dos tipos de extractos, uno directo (*extracto acuoso*) y un *extracto etanólico*, obtenido tras un proceso de maceración entre el mosto y los componentes sólidos de la uva en presencia de un 12% de etanol.

Conviene recordar que la vinificación en blanco se encuentra caracterizada, de manera general, por una ausencia de maceración entre el mosto/vino y el resto de los constituyentes de la uva. La principal razón radica en la excesiva carga fenólica que poseería un vino que no se suele someter a crianza y envejecimiento y cuyo periodo de vida útil rara vez se sitúa más allá de los dos años posteriores a su elaboración. Por tanto, extrapolando la capacidad antioxidante de los extractos acuosos se podrá obtener una indicación de las variedades más adecuadas para la elaboración de vinos blancos con alta capacidad antioxidante.

Por otro lado, a lo largo del proceso de elaboración del vino tinto, se produce una extracción de los compuestos fenólicos del hollejo, favorecida por la presencia del etanol formado durante la fermentación alcohólica (Pinelo y col., 2006). Con el fin de evaluar qué variedades de uva serían las más adecuadas, en condiciones de maceración fermentativa con hollejos, se llevó a cabo un pequeño estudio para determinar las condiciones aceleradas más favorables de extracción, aquellas que permitan extraer una mayor cantidad de compuestos fenólicos sin degradarlos, optimizándose el protocolo de extracción propuesto por Jensen y col., 2008). Para ello se utilizaron distintas combinaciones de temperatura y tiempo, llegando a la conclusión de que las mejores condiciones correspondieron a un proceso de maceración a 45°C, durante 2 horas y con una agitación orbital constante de 200 rpm (datos no mostrados). En todos los experimentos planteados se añadió un 12% de etanol al medio de maceración, tomado como el valor estándar de grado alcohólico que suelen presentar los vinos.

Sin embargo, en ocasiones las bodegas apuestan por la realización de otro tipo de vinificaciones menos convencionales. De esta manera, se realizan maceraciones prefermentativas e incluso fermentaciones en presencia de hollejos a partir de variedades de uva blanca (Ribéreau-Gayon, 2006). Asimismo, la vinificación de vinos rosados se lleva a cabo mediante la maceración en frío de los hollejos con los mostos antes del comienzo de la fermentación alcohólica.

De esta manera, en el presente estudio, se prepararon extractos acuosos y etanólicos tanto de uvas blancas como tintas, lo que permite evaluar el potencial global de cada una de las variedades de uva estudiadas, así como la comparación del potencial de las uvas blancas con el de las tintas. En este sentido, se utilizaron 20 variedades de uva blanca y 26 variedades de uva tinta pertenecientes a la colección de Bodegas Torres S.A., escogidas, en general, por ser representativas de la zona noreste de la península ibérica o bien por cultivarse ampliamente a nivel internacional. Asimismo, se incluyeron nueve variedades ancestrales catalanas (principalmente uva tinta) recuperadas por Miguel Torres S.A. Los nombres y abreviaturas de estas variedades se recogen en las Figuras 3.1 y 3.2 del apartado de materiales y métodos.

4.1.1. Uvas blancas

4.1.1.1. Medida de la actividad antioxidante

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, no existe un único método de referencia con el que evaluar la actividad antioxidante de los extractos. De esta manera, para obtener la mayor información posible acerca del potencial antioxidante de las variedades de uva, se emplearon dos métodos distintos para su evaluación *in vitro*: el ensayo de la captación de radicales libres DPPH[•] y el ensayo del blanqueamiento del β -caroteno. La razón del uso de ambas metodologías radica en su complementariedad, puesto que mientras que el método del radical DPPH[•] nos proporciona una indicación de la capacidad que presenta un determinado extracto en captar radicales libres, el método del blanqueamiento del β -caroteno nos permite conocer la capacidad que tiene dicho extracto para neutralizar radicales peróxido, uno de los radicales con mayor incidencia a nivel orgánico. De esta manera, ambos métodos se consideran complementarios y permiten obtener una idea global sobre la capacidad antioxidante de los distintos extractos.

Los resultados obtenidos en la medida de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del radical DPPH• expresados como valor TEAC (mmol Trolox/L) de los extractos acuosos y etanólicos de las 20 variedades de uva blanca, se muestran en las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 y en la Tabla A.1 del Anexo.

El valor TEAC de los extractos acuosos varió entre 0,2 y 13,6 mmol Trolox/L (Figura 4.1). Analizando los datos por variedades se observó que el extracto más activo correspondió al obtenido a partir de la variedad RO seguida de los extractos de RI, MR y GW, perfilándose como las variedades más adecuadas para la elaboración de un vino blanco con una alta actividad antioxidante. A continuación, se sitúan un grupo de variedades con valores medios de actividad antioxidante: FB, VG, CH y VAR 31, seguidas a cierta distancia por GB, AL, PA, CB, FI, UB, VE y MF. Por otro lado, los extractos más pobres correspondieron a las variedades MC, MA, SB, y XA.

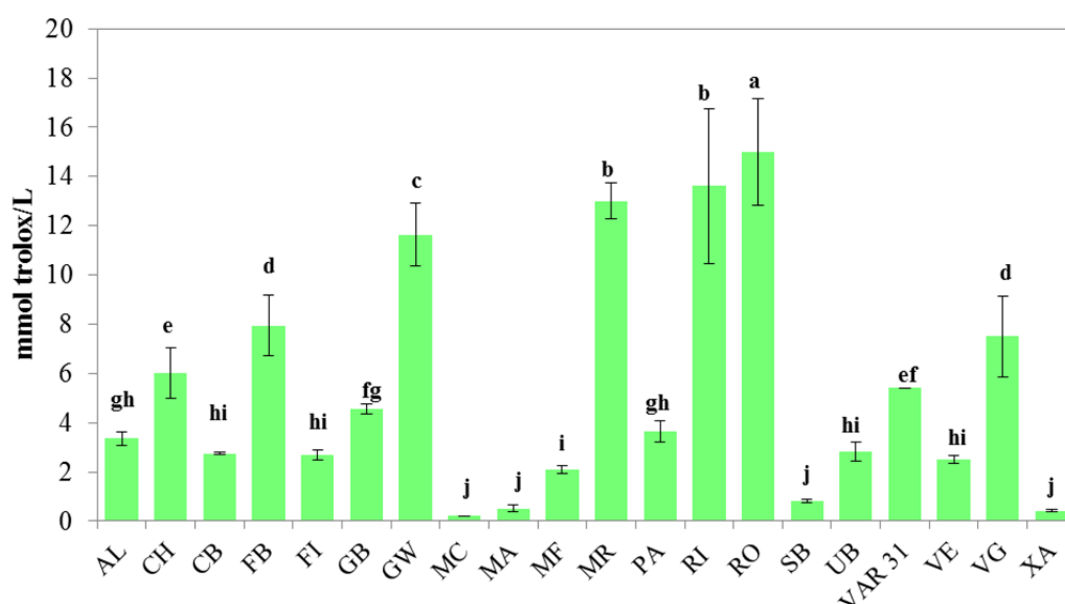


Figura 4.1. Valor TEAC de los extractos acuosos de uva blanca.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En este sentido, Fernández-Pachón y col., 2004) describieron, para vinos blancos, valores TEAC similares a los obtenidos en el presente estudio para variedades como MC, MA o MF, entre otras, aunque con valores significativamente inferiores a los registrados para RI o RO (entre otras), lo que podría estar relacionado con la disminución progresiva de la actividad antioxidante a lo largo del proceso de

vinificación que sufren los vinos (Villaño y col., 2006). El análisis estadístico demostró la gran diversidad de resultados encontrados (Álvarez y col., 2006; Becatti y col., 2010).

Los extractos etanólicos (Figura 4.2), en general, siguieron el mismo patrón que los acuosos aunque con valores TEAC considerablemente más altos (0,2 – 30,1 mmol Trolox/L) y con ligeras diferencias en cuanto al orden de variedades. De esta manera, los extractos etanólicos más activos resultaron ser los de RI, seguidos de los de VG, RO, MR, GW, AL y FB. Nuevamente las variedades MC y MA junto con SB produjeron los extractos más pobres en actividad antioxidante.

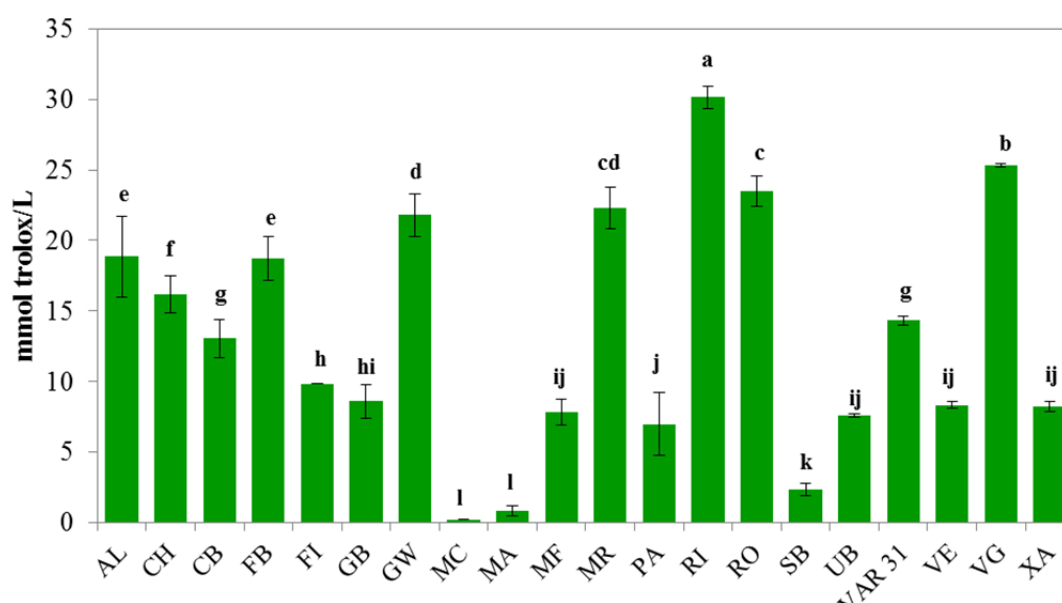


Figura 4.2. Valor TEAC de los extractos etanólicos de uva blanca.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Los extractos acuosos mostraron, en general, una menor actividad que sus correspondientes etanólicos (Figura 4.3), excepto en las variedades MA y MC en las que ambos tipos de extracto mostraron contenidos similares. En este sentido, el etanol permite, en general, una mayor extracción de compuestos antioxidantes de la matriz, lo que se atribuiría a la mayor extracción de compuestos fenólicos que se produciría en estas condiciones, procedentes principalmente del hollejo (Amrani y col., 1995; Canals y col., 2005; Pinelo y col., 2006). De esta manera, la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de las variedades con mayor actividad como

RI, VG, RO, MR y GW sería comparable con la encontrada en algunos vinos tintos (Arcari y col., 2013; Šeruga y col., 2011; Stratil y col., 2008).

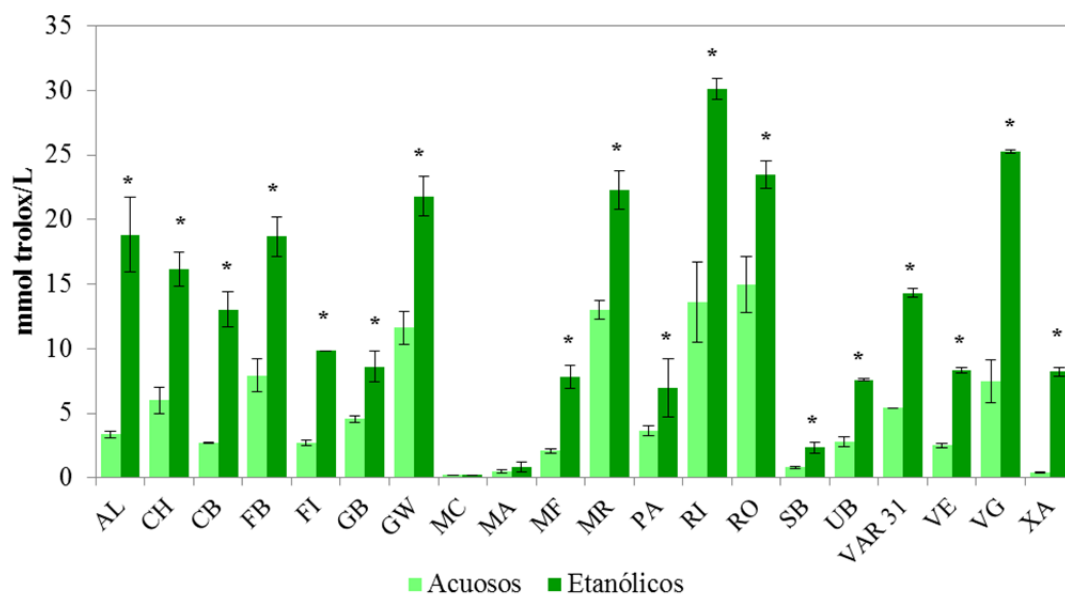


Figura 4.3. Comparación del valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de uva blanca.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

Para la mayoría de las variedades la relación entre la actividad de los extractos etanólicos y acuosos se sitúa en torno a 3. Sin embargo, no todas las variedades mostraron el mismo incremento; mientras que para variedades como FI, GB, PA, MR, y VE el incremento es moderado, para otras variedades como AL y CB los extractos etanólicos poseían una actividad antioxidante hasta 5 veces superior a la de su correspondiente extracto acuoso. Este comportamiento parece indicar que el hollejo de ciertas variedades de uva blanca posee un alto potencial como fuente de compuestos antioxidantes mientras que en otras variedades este efecto es más moderado o incluso inexistente, como en el caso de las variedades MA y MC.

En este sentido, Landrault y col., 2001) observaron un claro aumento de la actividad antioxidante de un vino elaborado a partir de Chardonnay (CH) utilizando la metodología de vinificación en tinto, obteniendo un valor TEAC de 13,8 mmol Trolox/L, similar a la del extracto etanólico obtenido en este estudio.

Por otro lado, la medida de la actividad antioxidante de los extractos mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno, se evaluó a tres niveles de muestra diferentes (sin diluir, dilución 1/5 y dilución 1/10), expresándose los resultados en % de actividad antioxidante (%AA). Hay que tener en cuenta que los radicales peroxilo constituyen uno de los radicales con mayor incidencia a nivel orgánico, implicados por ejemplo en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLs).

En este caso los resultados obtenidos se encuentran reflejados en las Tablas A.2 (extractos acuosos) y A.3 (extractos etanólicos) del Anexo. En todos los casos se observó un comportamiento dosis-respuesta, de tal manera que se produjo una disminución en el porcentaje de actividad antioxidante al aumentar la dilución del extracto. Con el fin de facilitar la comparación de los extractos, en las Figura 4.4 y 4.6, únicamente se reflejan los porcentajes de actividad obtenidos para la dilución 1/5 de los extractos.

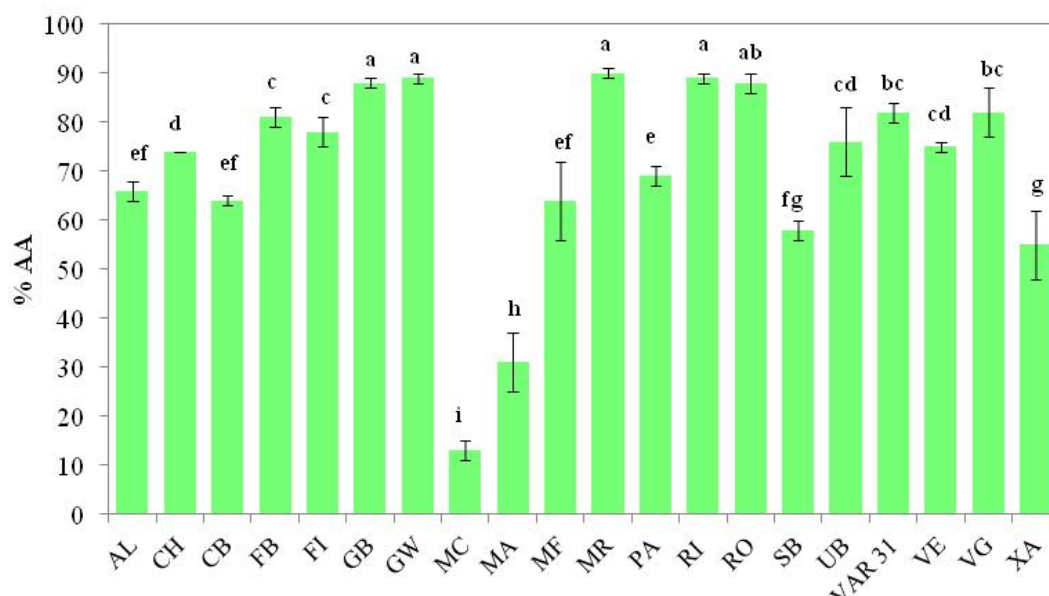


Figura 4.4. Actividad antioxidante (%) de los extractos acuosos de uva blanca (dilución 1/5).

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Respecto a los extractos acuosos (Figura 4.4), se observó que los extractos procedentes de las variedades MR, RI, GW y GB, junto con RO mostraban la mayor actividad, seguidos de los obtenidos a partir de las variedades VAR 31, VG, FB, FI, UB, VE y CH. En el otro extremo los extractos de las variedades MC y MA, con menos del 40% de la actividad antioxidante, resultaron, de manera diferenciada, los menos activos. Este ensayo se ha utilizado de manera habitual en la medida de la

actividad antioxidante de extractos procedentes de numerosas fuentes vegetales como curry (Mishra y col., 2009), algas (Xin Yan, 2010), u hojas de té (von Gadow y col., 1997), entre otros, incluyendo la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de uva (Katalinic y col., 2004; Kulisic y col., 2004; Terpin y col., 2009; Prieto y col., 2012). Sin embargo, no existe un protocolo estándar, de tal manera que las distintas variaciones en los protocolos utilizados, así como en la expresión de resultados dificulta la comparación con otros estudios.

Una vez estudiado el potencial antioxidante de los extractos de uva, se llevó a cabo un análisis sobre la posible correlación existente entre los resultados obtenidos por ambas metodologías (Figura 4.5), para lo cual se comparó el valor TEAC con el volumen (mL) de extracto utilizado para obtener un 70% de actividad antioxidante en el método del blanqueamiento del β -caroteno. Se observó que efectivamente existe una correlación entre la información obtenida por ambas metodologías. Hay que precisar que esta correlación es de tipo exponencial debido a que en los cálculos para la determinación del porcentaje de la actividad antioxidante mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno, se emplean logaritmos neperianos. Conviene recordar que la comparación entre los resultados obtenidos haciendo uso de distintas metodologías de actividad antioxidante es necesaria para poder llegar a resultados fiables (Prior y col., 2005; Anastasiadi y col., 2010; Prior y col., 2005).

Por otra parte, los extractos etanólicos procedentes de las variedades MA y MC mostraron, nuevamente, los peores resultados (Figura 4.6), con porcentajes de AA inferiores al 70%. Asimismo, los extractos procedentes de las variedades SB y PA mostraron mayores porcentajes de AA que los anteriormente citados, pero significativamente inferiores al resto. Estos resultados son similares a los obtenidos en la metodología del radical DPPH[•]. En este caso, los extractos más activos se obtuvieron con las variedades MR, RI, GW y FB, con diferencias mínimas respecto a un amplio grupo de variedades. Hay que hacer notar el alto porcentaje de actividad antioxidante mostrado, en general, por todos los extractos, cercanos al 100% AA, lo que originó que hubiera muchos extractos con actividades muy similares. En este sentido, un análisis de los resultados obtenidos a una dilución de 1/10 posiblemente habría producido mayores diferencias entre los extractos etanólicos, pero habría dificultado su comparación con los extractos acuosos. Asimismo, pese a la alta actividad de los extractos, el análisis estadístico realizado permite distinguir

claramente las variedades de uva blanca más y menos interesantes de cara al potencial antioxidante de sus extractos.

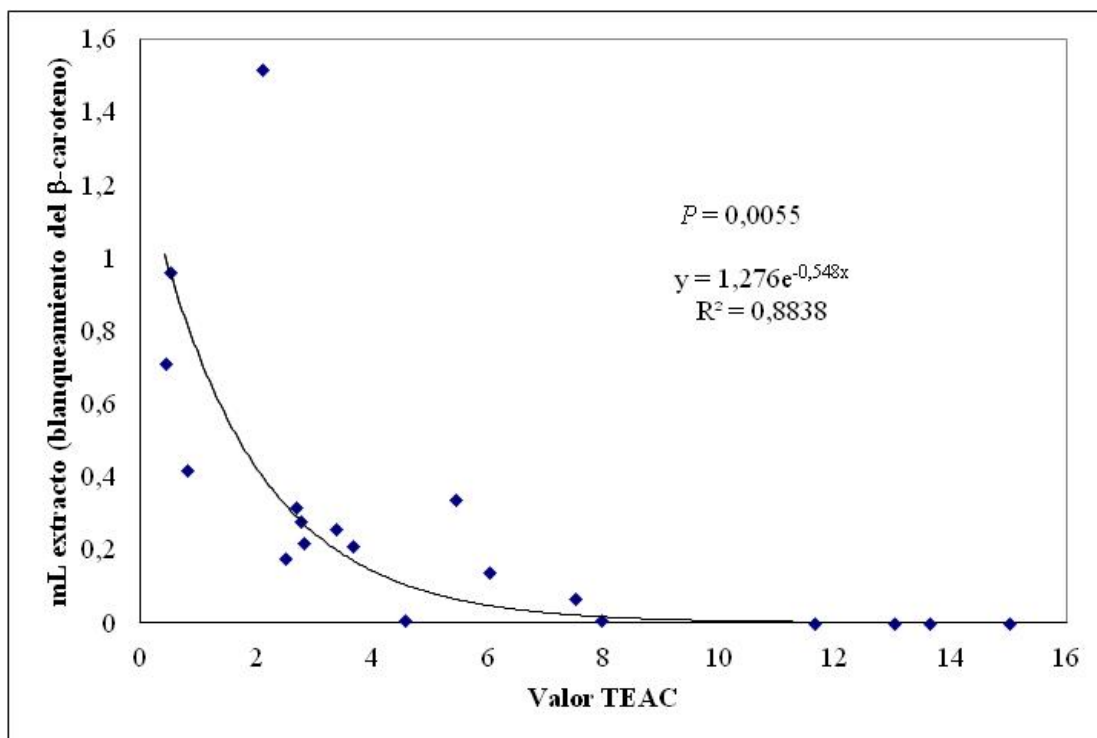


Figura 4.5. Correlación entre la actividad antioxidante de ambos métodos de los extractos acuosos de uvas blancas.

En este caso la comparación de los resultados obtenidos por ambas metodologías antioxidantes de los extractos etanólicos (Figura 4.7) dio lugar a resultados similares a los ya registrados en los extractos acuosos, estableciéndose una alta correlación significativa ($p < 0,01$).

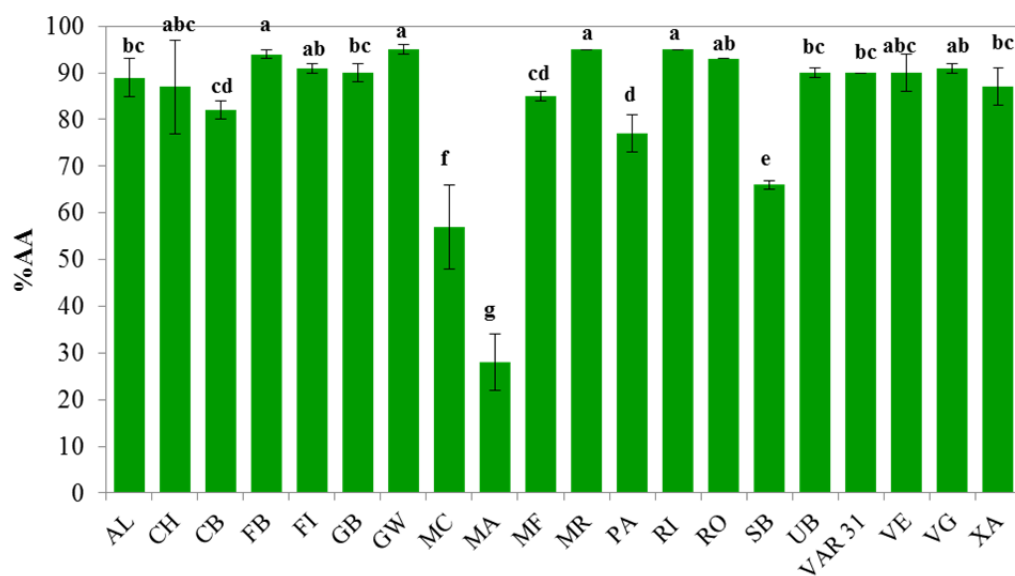


Figura 4.6. Actividad antioxidante (%) de los extractos etanólicos de uva blanca (dilución 1/5).

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

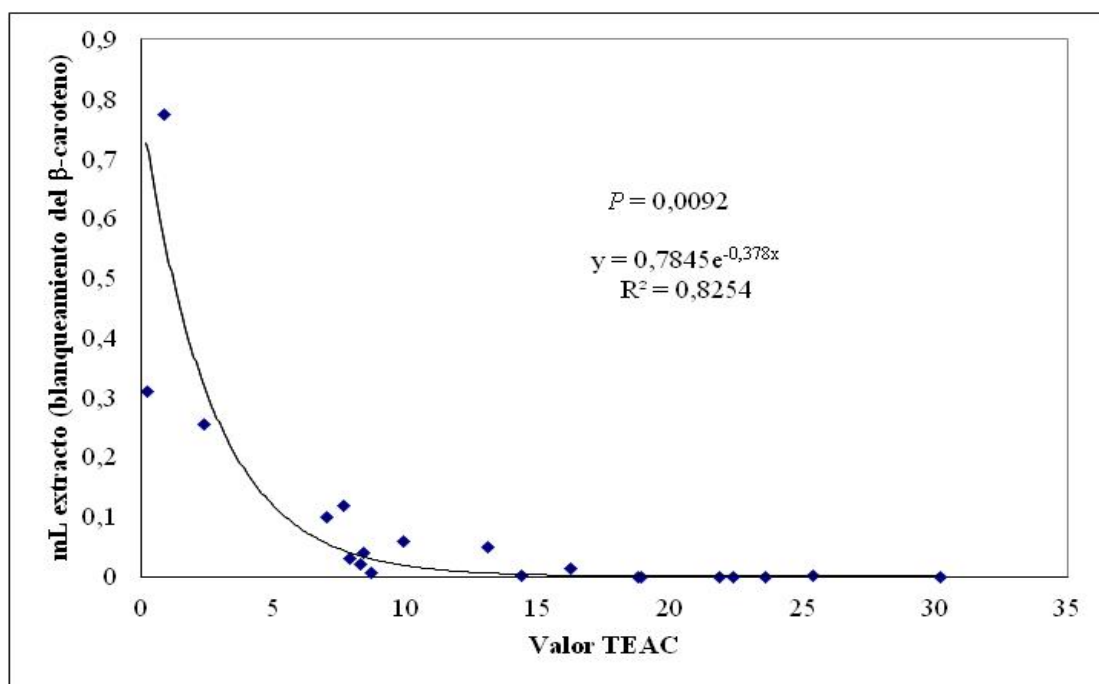


Figura 4.7. Correlación entre la actividad antioxidante de ambos métodos de los extractos etanólicos de uvas blancas.

Por último, como se puede observar en la Figura 4.8, los extractos etanólicos de todas las variedades, excepto los de MA, mostraron un porcentaje de AA superior a sus correspondientes acuosos, en consonancia con los resultados obtenidos para el ensayo del radical DPPH[•].

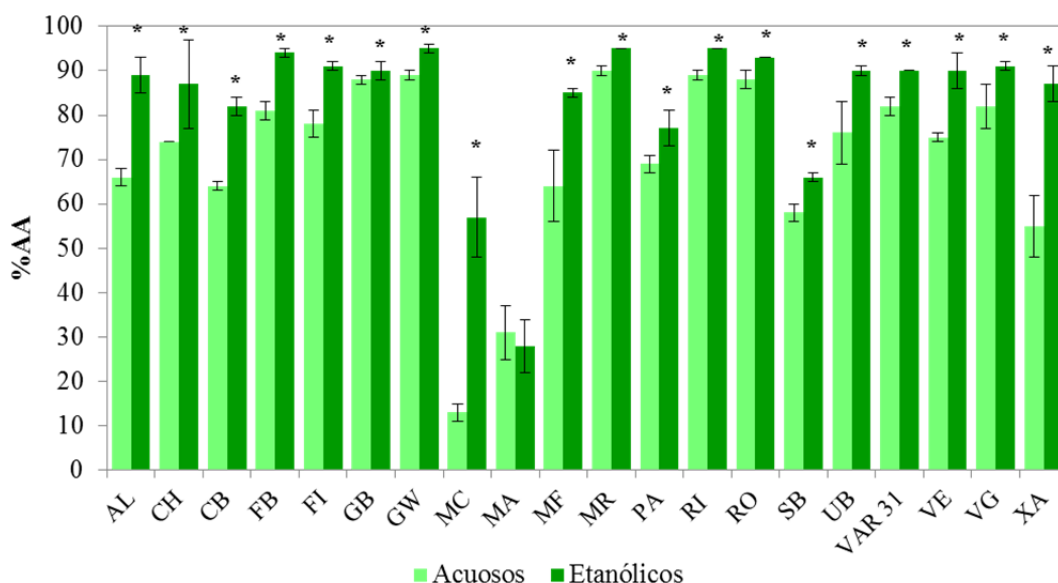


Figura 4.8. Comparación entre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos acuosos y la de los etanólicos de uva blanca (dilución 1/5).

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

La obtención de extractos más activos con una solución hidroalcohólica que con una acuosa no es exclusiva de las uvas. En este sentido existen estudios en los que el empleo de etanol, en lugar de agua, permitió la obtención de extractos más activos a partir de diferentes tipos de algas (Xin Yan, 2010) o de hojas de curry (Mishra y col., 2009).

4.1.1.2. Análisis de la composición fenólica

Determinación de los compuestos fenólicos totales

Como paso previo al análisis individualizado de la composición fenólica de los extractos se llevó a cabo la determinación del IPT o Índice de Polifenoles Totales en los extractos tanto acuosos como etanólicos (Figura 4.9 y Figura 4.12, respectivamente). Esta determinación, realizada a la longitud de onda

correspondiente al máximo de absorción característico de todos los compuestos fenólicos (aproximadamente 280 nm), proporciona una idea global del contenido en compuestos fenólicos de una muestra líquida, permitiendo la comparación entre distintas muestras. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, los nucleótidos, aminoácidos aromáticos, péptidos y proteínas con anillos aromáticos, también son capaces de absorber luz a esa longitud de onda (Harbertson y col., 2006), por lo que la medida del IPT no permite una cuantificación fidedigna del contenido en compuestos fenólicos; sin embargo dada su sencillez y rapidez es muy utilizado en enología, con el fin de establecer una comparativa entre diferentes muestras ricas en dichos compuestos (Mataix y col., 2001; Cetó y col., 2012; Arribas y col., 2013). En este sentido, la metodología más empleada para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos es aquella que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (Total Polyphenols Content) (TPC), inicialmente propuesta por Singleton y Rossi (Singleton y col., 1965). Son numerosos los investigadores que abogan por el uso de esta metodología y no del IPT puesto que permite la cuantificación de los compuestos fenólicos, además de evitar la interferencia de un mayor número de compuestos que el IPT (Singleton y col., 1999; Roussis y col., 2008; Šeruga y col., 2011). Sin embargo, su medida tampoco se corresponde de manera fidedigna con el contenido real en compuestos fenólicos, puesto que en este caso también existe interferencia de otros compuestos (azúcares, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros) (Singleton y col., 1999).

Como paso previo a este estudio se llevó a cabo una comparación entre los datos obtenidos de IPT y de TPC para los extractos acuosos de uva blanca y tinta, obteniéndose, en ambos casos, una alta correlación entre ambos ensayos (datos no mostrados). De esta manera y dada la mayor simplicidad del IPT se decidió utilizar esta medida en todos los extractos analizados.

Los extractos acuosos de las variedades RI y RO junto con MR y GW mostraron los IPTs más elevados (Figura 4.9). Por el contrario, las variedades MC seguida de MA, MF, SB, UB y XA proporcionaron los extractos acuosos con menor contenido en compuestos fenólicos. Por su parte, variedades como CH, FB, GB y VG, junto con AL, CB, VAR 31 y PA mostraron extractos con valores medios de IPT.

Como primera aproximación a la posible relación entre la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos, se llevó a cabo la representación de la correlación existente entre ambas medida provenientes de los extractos acuosos. De esta manera, en la Figura 4.10 se muestra la correlación obtenida entre el valor TEAC y el IPT, mientras que en la Figura siguiente (Figura 4.11) se puede observar la correspondiente al porcentaje de AA y el IPT.

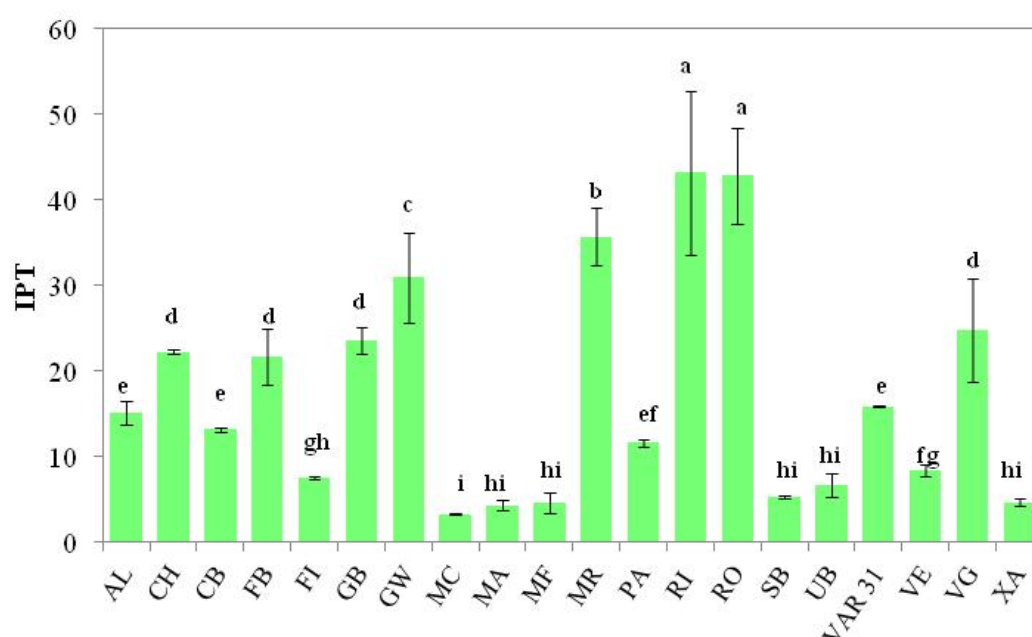


Figura 4.9. Índice de polifenoles totales (IPT) de los extractos acuosos de uva blanca.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

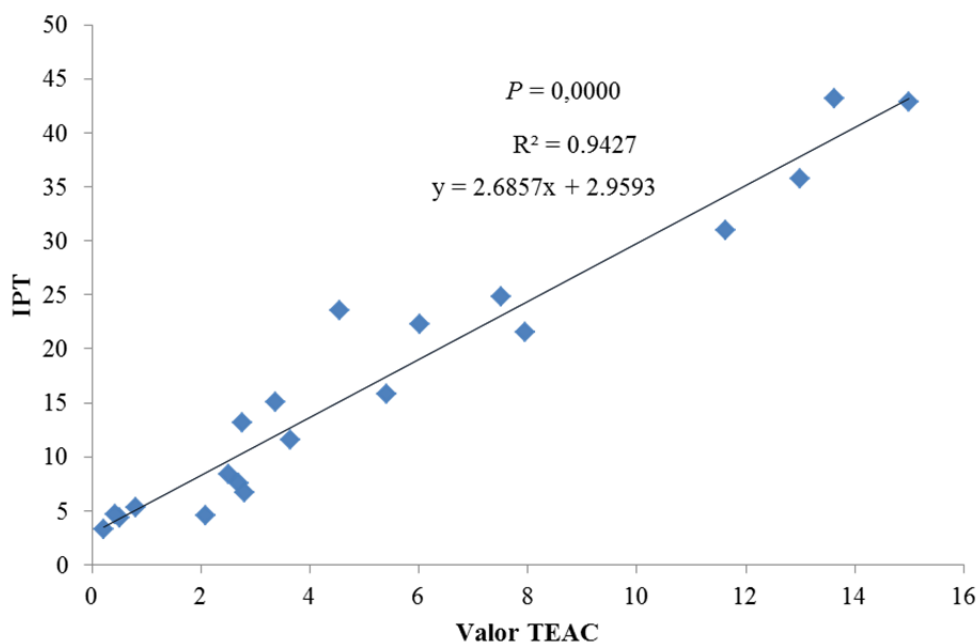


Figura 4.10. Correlación entre el Índice de Polifenoles Totales (IPT) y el valor TEAC de los extractos acuosos de uva blanca.

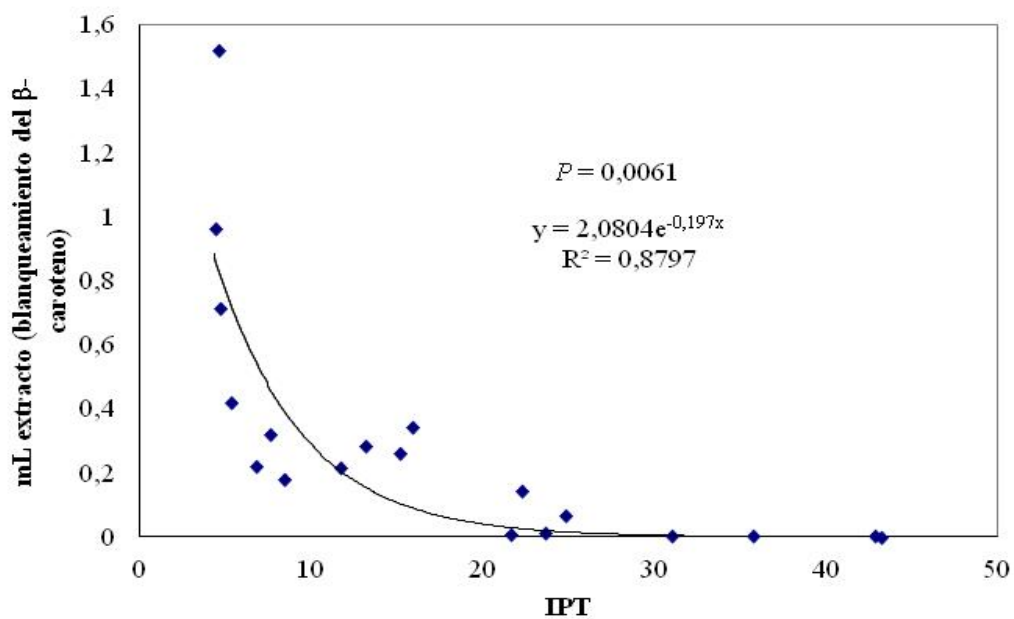


Figura 4.11. Correlación entre el IPT y el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA = 70) de los extractos acuosos de uva blanca.

Ambas metodologías mostraron una alta correlación entre la actividad antioxidante y el IPT, aunque en el caso del método del radical DPPH \bullet la correlación

fue mayor que en el caso del blanqueamiento del β -caroteno. En ambos casos, la correlación con el IPT fue muy significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ para el valor TEAC y el %AA, respectivamente). Estas correlaciones apoyarían la hipótesis de que la actividad antioxidante sería principalmente atribuible al contenido en compuestos fenólicos de los extractos acuosos. En este sentido, son numerosos los artículos donde se ha encontrado una alta correlación entre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de vino blanco, independientemente del método empleado en dichas determinaciones (Alonso Borbalán y col., 2003; Fernández-Pachón y col., 2004; Kondrashov y col., 2009; Vrèek y col., 2011).

Sin embargo, a pesar de esta alta correlación, se puede observar cómo algunos extractos muestran una ligera desviación respecto al modelo de regresión propuesto. En este sentido, los extractos acuosos de MF y UB mostraron actividades antioxidantes superiores a las que cabría esperar por su IPT, mientras que el extracto acuoso de GB presentó una actividad inferior a la que cabría esperar. Estas desviaciones se podrían atribuir a la presencia de compuestos antioxidantes que no absorben a 280 nm. En este sentido, se ha descrito la presencia de vitaminas C y E en variedades de uva blanca, que avalarían dicha hipótesis (Tangolar y col., 2011; Marselles-Fontanet y col., 2013; Songsermsakul y col., 2013). Asimismo, estas desviaciones podrían estar relacionadas con diferencias en el perfil fenólico de los diferentes extractos. Hay que tener en cuenta que no todos los compuestos fenólicos presentes en las uvas muestran la misma actividad antioxidante, ni se encuentran presentes en la misma proporción, de tal manera que tanto el aumento en el contenido de compuestos fenólicos, como la variación de su perfil pueden suponer variaciones de la actividad antioxidante de las uvas o de sus extractos (Di Majo y col., 2008; Iacopini y col., 2008; Katalinic y col., 2010). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo un exhaustivo análisis de la composición de dichos extractos.

En la Figura 4.12 se muestran los resultados obtenidos en la medida del IPT de los extractos etanólicos de uvas blancas. Nuevamente, los extractos con mayor IPT correspondieron a las variedades RI y RO, seguidas de VG, MR y AL.

Asimismo, MC junto con MA y SB mostraron los IPTs más bajos. El resto de extractos mostraron contenidos medios de compuestos fenólicos.

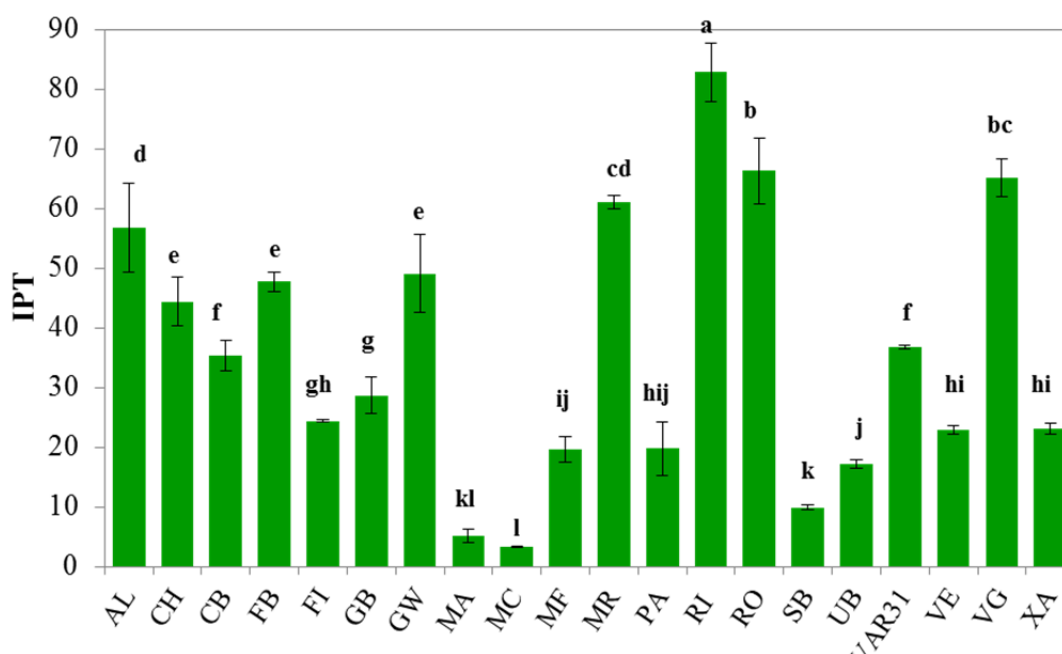


Figura 4.12. Índice de polifenoles totales (IPT) de los extractos etanólicos de uva blanca.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Como ya ocurriera con los extractos acuosos se encontró una correlación significativa entre la actividad antioxidante y el IPT de los extractos etanólicos (Figuras 4.13 y 4.14), siendo, nuevamente, más significativa en el caso del método del radical DPPH[•] que para el blanqueamiento del β -caroteno (Fernández-Pachón y col., 2004). Katalinić y col., (2004), utilizando una fórmula de cálculo no logarítmica del porcentaje de la actividad antioxidante en el método del blanqueamiento del β -caroteno, observaron una correlación lineal entre ambos métodos de actividad antioxidante y el contenido global en compuestos fenólicos. Asimismo, observaron que para el método del DPPH[•] los flavanoles tenían una actividad similar a los flavanoles, pero en cambio en el ensayo del blanqueamiento del β -caroteno los segundos poseían seis veces más actividad que los primeros.

Dentro de los extractos analizados en la presente memoria, las variedades GW y UB mostraron valores TEAC inferiores a los previstos, mientras que para AL se observó el caso contrario. De esta manera, se confirma el comportamiento

anómalo de la variedad UB respecto a la relación entre la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos.

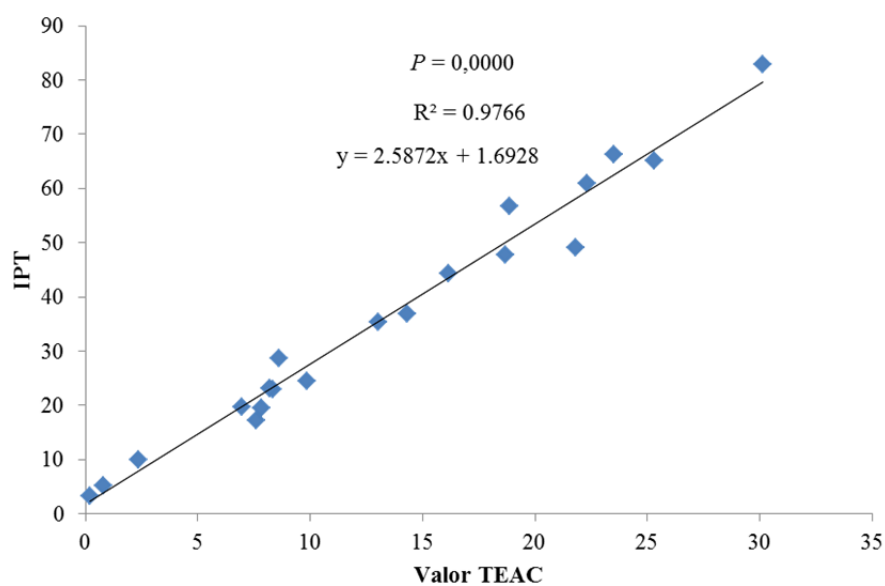


Figura 4.13. Correlación entre el IPT y el valor TEAC de los extractos etanólicos de uva blanca.

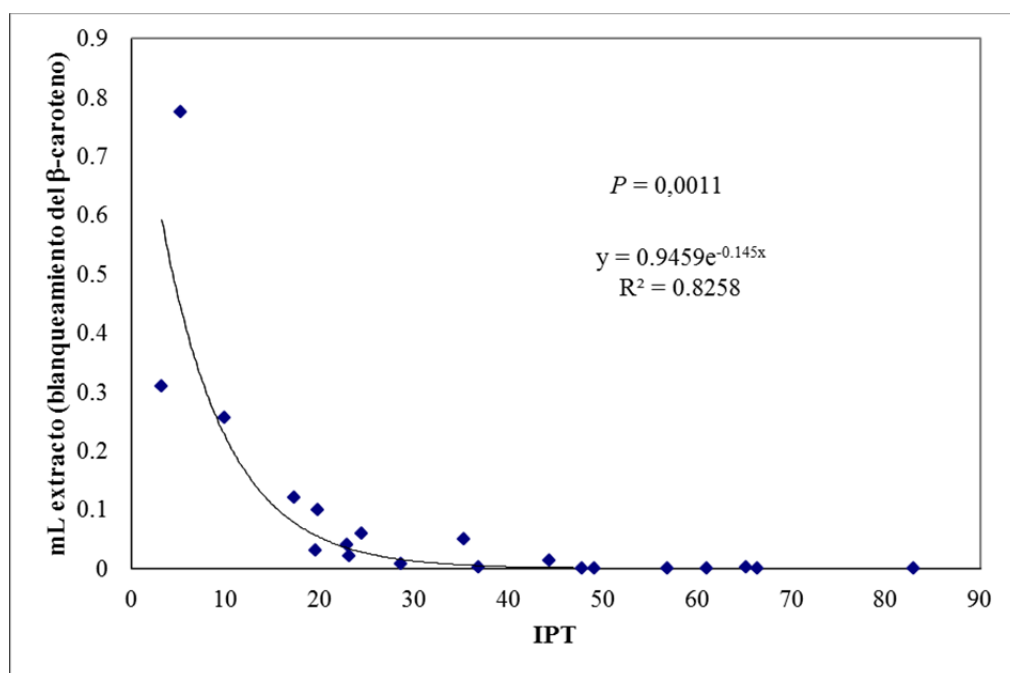


Figura 4.14. Correlación entre el IPT y el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA = 70) de los extractos etanólicos de uva blanca.

Por último, se llevó a cabo la comparación entre el IPT de los extractos acuosos y etanólicos, dentro de una misma variedad (Figura 4.15). Como era de

esperar, la maceración de los hollejos en presencia de un 12% de etanol provocó un aumento en el IPT, excepto en aquellos procedentes de MC y MA. De esta manera se confirma el importante papel que el hollejo de ciertas variedades podría jugar de cara a la formulación de un vino blanco enriquecido en compuestos antioxidantes. Estos resultados coinciden con los encontrados por diversos autores, donde la maceración de los mostos con sus hollejos siempre da lugar a un enriquecimiento en compuestos fenólicos (Anastasiadi y col., 2010; Pérez-Jiménez y col., 2010; Pinelo y col., 2006).

Análisis por HPLC-PAD y UPLC-PAD de los compuestos fenólicos

Una vez estudiada la posible correlación entre la actividad antioxidante de los extractos y el valor global de compuestos fenólicos, se llevó a cabo, mediante HPLC-PAD, un análisis pormenorizado de los compuestos fenólicos monoméricos presentes en ambos tipos de extractos (Tablas A.5 y A.6 del Anexo). Con el fin de simplificar la comprensión de los resultados obtenidos, en la Tabla 4.1 se muestra la composición fenólica de los extractos acuosos procedentes de uva blanca por familias de compuestos en vez de en forma individualizada.

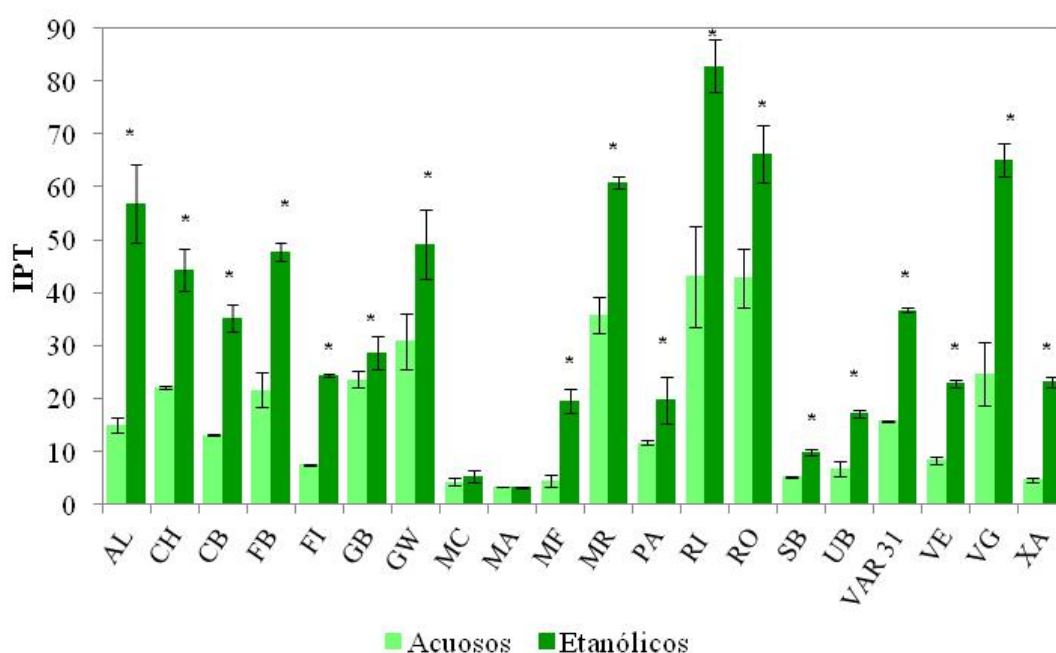


Figura 4.15. IPT de los extractos acuosos y etanólicos de uva blanca.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

Respecto a la composición fenólica de los extractos acuosos (Tabla 4.1) los distintos compuestos analizados se correspondieron con las siguientes familias: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, flavanoles y

flavonoles. Todas ellas ampliamente descritas en vinos blancos (Arcari y col., 2013; Cáceres-Mella y col., 2014; Sen y col., 2014; Tourtoglou y col., 2014).

Tabla 4.1: Composición fenólica por familias en los extractos acuosos de las variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Σ Ácidos hidroxibenzóicos (mg/L) | Σ Ácidos hidroxicinámicos (mg/L) | Σ Estilbenos (mg/L) | Σ Flavanoles (mg/L) | Σ Flavonoles (mg/L) |
|-------|---|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AL | $0,60 \pm 0,08^*$ | $0,02 \pm 0,010$ | $1,26 \pm 0,03$ | $5,03 \pm 3,46$ | $10,96 \pm 0,97$ |
| CB | $0,19 \pm 0,09$ | $0,04 \pm 0,019$ | n.d. | n.d. | $0,53 \pm 0,22$ |
| CH | $0,34 \pm 0,04$ | $0,03 \pm 0,018$ | n.d. | n.d. | n.d. |
| FB | $0,55 \pm 0,54$ | n.d. | n.d. | $5,61 \pm 4,05$ | $12,72 \pm 4,65$ |
| FI | $0,53 \pm 0,13$ | n.d. | n.d. | $1,93 \pm 0,51$ | $11,38 \pm 0,77$ |
| GB | $0,16 \pm 0,05$ | $0,13 \pm 0,051$ | n.d. | $3,76 \pm 2,25$ | $3,91 \pm 1,07$ |
| GW | $0,79 \pm 0,88$ | n.d. | $0,35 \pm 0,26$ | $28,29 \pm 21,08$ | $4,89 \pm 0,13$ |
| MA | $0,05 \pm 0,02$ | $0,02 \pm 0,002$ | n.d. | n.d. | n.d. |
| MC | $0,16 \pm 0,03$ | $0,05 \pm 0,003$ | n.d. | $0,82 \pm 0,39$ | n.d. |
| MF | $0,36 \pm 0,02$ | n.d. | n.d. | n.d. | $6,17 \pm 1,05$ |
| MR | $0,87 \pm 0,04$ | n.d. | $0,21 \pm 0,03$ | n.d. | $13,48 \pm 0,12$ |
| PA | $0,25 \pm 0,12$ | $0,03 \pm 0,003$ | n.d. | $3,18 \pm 0,06$ | n.d. |
| RI | $0,11 \pm 0,01$ | $0,23 \pm 0,005$ | n.d. | $1,65 \pm 1,23$ | n.d. |
| RO | $0,65 \pm 0,20$ | n.d. | n.d. | $51,87 \pm 0,32$ | $21,57 \pm 1,18$ |
| SB | $0,40 \pm 0,00$ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| UB | n.d. | n.d. | n.d. | $12,40 \pm 8,01$ | n.d. |
| VAR31 | $0,12 \pm 0,07$ | n.d. | n.d. | $7,13 \pm 0,52$ | $6,33 \pm 8,95$ |
| VE | $0,33 \pm 0,16$ | n.d. | n.d. | $57,16 \pm 33,19$ | $8,39 \pm 0,35$ |
| VG | $0,48 \pm 0,24$ | n.d. | n.d. | $0,94 \pm 0,45$ | n.d. |
| XA | $0,35 \pm 0,02$ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

*Media \pm S.D.; n.d.= no detectado

Como se puede observar no existe un comportamiento homogéneo de todos los extractos acuosos. De esta manera, no todas las familias de compuestos fenólicos

se encontraban presentes en todos los extractos, como ya ocurría en otros estudios (Vuorinen y col., 2000 Katalinić y col., 2010), lo que pone de manifiesto la gran influencia de la variedad de uva en la composición fenólica de la misma. En este sentido, la familia de los ácidos hidroxibenzóicos se encontraba presente en todos los extractos acuosos analizados, a excepción de los procedentes de la variedad UB. Asimismo, la familia de los flavanoles y flavonoles también se hallaron en la mayoría de los extractos. Por su parte, no se hallaron ácidos hidroxicinámicos en un amplio grupo de extractos, mientras que los estilbenos sólo se identificaron en las variedades AL, GW y MR.

Los flavanoles constituyeron la familia más abundante en aquellos extractos en los que se encontraban presentes, variando su contenido entre 0,82 en MC y 57 mg/L en VE. Dentro de esta familia la catequina y epicatequina fueron los compuestos más abundantes (Tabla A.5 del Anexo).

En general, los valores de flavanoles encontrados fueron superiores a los descritos en la bibliografía (Chamkha y col., 2003; Roussis y col., 2008), aunque, en el caso de variedades como AL y FB, entre otras, se correspondieron con los contenidos mostrados por otros estudios (de Beer, 2002; Manach y col., 2004; Pérez-Jiménez y col., 2010).

Respecto a los flavonoles, con concentraciones que variaron entre los 0,53mg/L de CB hasta los 22 mg/L de RO, se identificaron siete compuestos, todos ellos esterificados con otros compuestos como azúcares o ácidos orgánicos, aunque debido a su bajo contenido sólo se cuantificaron dos: la quercetina 3-O-glucósido y la quercetina 3-O-galactósido. Asimismo, para algunas variedades, los contenidos encontrados fueron similares a los mostrados en otros estudios (Manach y col., 2004; Pérez-Jiménez y col., 2010).

Conviene recordar que las pepitas constituyen la principal fuente de flavanoles, mientras que los hollejos lo son de flavonoles (Ribéreau-Gayon y col., 2000). De esta manera, los contenidos presentes en los extractos acuosos de estos compuestos deberían ser relativamente bajos, como ocurre para la mayoría de variedades. Sin embargo, los valores inusualmente altos de flavanoles y flavonoles presentes en algunos extractos, podrían estar relacionados con la variedad de uva analizada, pero también con el método de extracción empleado. En este sentido, el

método utilizado para obtener estos extractos pudo provocar la ruptura de algunas pepitas y una ligera disminución de tamaño de los hollejos provocando un aumento en el grado de extracción de este tipo de compuestos.

Los principales ácidos hidroxibenzóicos analizados estaban constituidos por los ácidos gálico, siríngico y vainílico, dentro de los cuales el gálico resultó ser el mayoritario (Chamkha y col., 2003; Castillo-Muñoz y col., 2010). Su contenido variaba entre los 0,11 mg/ l de RI y los 0,87 mg/L detectados en MR (Tabla A.5 del Anexo). Cabe destacar que el contenido en estos ácidos encontrado en vinos blancos resulta muy variable, encontrándose desde trazas hasta una decena de mg/L (Arcari y col., 2013; Cáceres-Mella y col., 2014; Tourtoglou y col., 2014). Este tipo de compuestos se encuentran habitualmente en forma esterificada o glucosidada lo que podría estar relacionado con el comportamiento del extracto de UG, donde no se detectó ninguno de estos compuestos (Pérez-Jiménez y col., 2010).

Por otra parte, los ácidos trans-cafeico, ferúlico y p-cumárico fueron los principales ácidos hidroxicinámicos analizados, constituyendo de 0,020 mg/L para MA hasta los 0,232 mg/L de RI. Estos contenidos coinciden con los resultados mostrados en otros estudios (Alén-Ruiz y col., 2009; Betés-Saura y col., 1996; Chamkha y col., 2003; Landrault y col., 2001).

Por último, respecto a los estilbenos sus valores se situaron entre los 0,21 mg/L de MR y los 1,26 mg/L de AL. Se cuantificaron cis-piceido, trans-piceido, cis-resveratrol, así como trans-resveratrol como los principales estilbenos presentes en los extractos acuosos, con contenidos, en general, similares a los encontrados en otros estudios (Jeandet y col., 2002; Kostadinoviæ y col., 2012).

Como se puede observar en la Tabla 4.1 no existe un comportamiento homogéneo de todos los extractos acuosos, ni siquiera entre los extractos de una misma variedad de uva, tal como se puede comprobar por las desviaciones estándar entre muestras de una misma uva. El motivo podría estar relacionado con el hecho de que los granos se tomaron sin considerar una posible falta de uniformidad. En la Figura 4.16 se observa cómo existía una cierta heterogeneidad entre racimos, incluso entre granos dentro de un mismo racimo.

El efecto de esta variabilidad no se observó en la actividad antioxidante o en el índice de polifenoles totales, ya que compuestos con distinta actividad antioxidante o contenido polifenólico total se compensaban entre ellos, pero en el análisis de los compuestos fenólicos se evidenciaron, demostrando variabilidad dentro de cada variedad. En este sentido, distintos artículos basados en la evolución de los compuestos fenólicos durante la madurez de la uva, demuestran que su contenido final en la uva puede aumentar hasta 3 veces respecto al envero (Alonso Borbalán y col., 2003; Cadot y col., 2006; Canals y col., 2005; Castillo-Muñoz y col., 2007). Asimismo los compuestos fenólicos pueden aumentar en función de otros factores como la radiación solar, el ataque microbiológico o heridas haciendo más fácil la extracción de monómeros (Cantos y col., 2003; Daniel y col., 1999; Gonzalez-Barrio y col., 2006).



Figura 4.16. Fotografía de uvas blancas maduras en viñedo.

Con respecto a los extractos etanólicos (Tabla 4.2) en general el contenido en compuestos fenólicos por familias fue mayor que en sus correspondientes acuosos, lo que estaría relacionado con su mayor solubilidad en una mezcla hidroalcohólica (12% de etanol/agua) (Yilmaz y col., 2004; Alonso Borbalán y col., 2003; Horax y col., 2010). Asimismo, en algunos extractos se detectaron familias de compuestos que no se habían detectado en sus correspondientes acuosos. De esta manera, se

detectaron ácidos hidroxibenzóicos, flavanoles, y flavonoles en la práctica totalidad de los extractos etanólicos.

Tabla 4.2. Composición fenólica por familias en los extractos etanólicos de las variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Σ Ácidos hidroxibenzóicos (mg/L) | Σ Ácidos hidroxicinámicos (mg/L) | Σ Estilbenos (mg/L) | Σ Flavanoles (mg/L) | Σ Flavonoles (mg/L) |
|-------|---|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AL | $3,00 \pm 0,06$ | n.d. | $1,42 \pm 0,10$ | $101,41 \pm 22,53^*$ | $22,26 \pm 4,03$ |
| CB | $0,40 \pm 0,06$ | $0,03 \pm 0,008$ | n.d. | $0,49 \pm 0,49$ | $19,42 \pm 1,35$ |
| CH | $0,24 \pm 0,00$ | $0,04 \pm 0,024$ | n.d. | $15,62 \pm 2,41$ | $7,82 \pm 4,67$ |
| FB | $2,14 \pm 0,28$ | n.d. | $0,59 \pm 0,02$ | $6,01 \pm 1,40$ | $4,24 \pm 0,19$ |
| FI | $1,48 \pm 1,06$ | n.d. | n.d. | $5,28 \pm 5,16$ | $22,14 \pm 5,20$ |
| GB | $0,33 \pm 0,01$ | $0,51 \pm 0,015$ | n.d. | $2,09 \pm 0,83$ | $11,35 \pm 2,50$ |
| GW | $2,51 \pm 0,72$ | n.d. | $1,38 \pm 0,60$ | $104,98 \pm 1,63$ | $7,23 \pm 0,03$ |
| MA | $0,26 \pm 0,12$ | $0,02 \pm 0,002$ | n.d. | n.d. | $4,98 \pm 3,15$ |
| MC | $0,46 \pm 0,12$ | $0,05 \pm 0,003$ | n.d. | $2,76 \pm 1,21$ | $1,42 \pm 2,01$ |
| MF | $1,62 \pm 0,94$ | n.d. | n.d. | $5,61 \pm 4,76$ | n.d. |
| MR | $5,59 \pm 0,17$ | $0,61 \pm 0,123$ | n.d. | $29,41 \pm 6,60$ | $9,10 \pm 1,68$ |
| PA | $1,10 \pm 0,11$ | $0,11 \pm 0,135$ | n.d. | $4,64 \pm 0,23$ | $9,18 \pm 0,53$ |
| RI | $3,42 \pm 0,93$ | $0,72 \pm 0,037$ | $0,64 \pm 0,06$ | $83,94 \pm 15,64$ | $12,87 \pm 3,42$ |
| RO | $0,38 \pm 0,2$ | n.d. | n.d. | $35,38 \pm 0,84$ | $18,49 \pm 2,06$ |
| SB | $1,50 \pm 0,25$ | $0,04 \pm 0,006$ | n.d. | $14,22 \pm 3,22$ | $2,09 \pm 2,95$ |
| UB | $0,51 \pm 0,29$ | n.d. | n.d. | $8,55 \pm 1,96$ | n.d. |
| VAR31 | n.d. | n.d. | n.d. | $1,58 \pm 0,43$ | $12,19 \pm 8,65$ |
| VE | n.d. | n.d. | n.d. | $30,46 \pm 14,86$ | $9,34 \pm 1,64$ |
| VG | $3,25 \pm 2,12$ | n.d. | n.d. | $45,80 \pm 32,22$ | $12,19 \pm 4,41$ |
| XA | $0,63 \pm 0,16$ | $0,02 \pm 0,012$ | $0,06 \pm 0,01$ | $6,95 \pm 8,06$ | $7,25 \pm 0,71$ |

*Media \pm SD; n.d.= no detectado

Los flavanoles, que se detectaron en todos los extractos excepto en los procedentes de MA, variaron su contenido entre 0,49 y 105 mg/L, que se corresponden con los obtenidos a partir de las variedades CB y GW, respectivamente. Cabe destacar el alto contenido en flavanoles de las variedades AL y RI, además de GW, en consonancia con los descritos por Manach y col., (2004), y superiores a los encontrados por Landrault y col., (2001) (3-9 mg/L de vino blanco sin maceración), aunque en este caso se estudiaron otras variedades de uva blanca.

Como se ha comentado anteriormente, la maceración de las uvas en presencia de un medio hidroalcohólico (extractos etanólicos) dio lugar a un incremento en el contenido de flavanoles en la mayoría de las variedades. Estos resultados coinciden con los obtenidos por numerosos autores en los que los monómeros y dímeros de flavanoles se encuentran en cantidades traza (pocos mg/L) en vinos blancos elaborados sin maceración (Betés-Saura y col., 1996; Chamkha y col., 2003; Ricardo da Silva y col., 1993), mientras que el contenido es mayor en vinos blancos sometidos a un proceso macerativo o en extractos obtenidos a partir de uva blanca (Anastasiadi y col., 2010).

En estos extractos también se observó una gran variabilidad intravarietal, que como ya se ha explicado podría atribuirse al distinto grado de maduración de la uva; de esta manera, una uva madura, estresada o rota permite una mayor extracción de estos compuestos procedentes del hollejo, favoreciendo una mayor presencia de monómeros, en detrimento de polímeros u otros compuestos complejos, por lo que éstos se presentarían en menor cantidad en los extractos. Esta heterogeneidad de las uvas también explicaría la mayor presencia de este tipo de compuestos en los extractos acuosos que en los etanólicos, como fue el caso de las variedades RO y VAR31.

Los flavonoles fueron, nuevamente, la segunda familia más abundante. Las cantidades encontradas fueron muy variables (desde 1 mg/L en MC hasta 22 mg/L en FI) en consonancia con las descritas en otros estudios (Cantos y col., 2002; Makris y col., 2006; Anastasiadi y col., 2010; Cantos y col., 2002a; Makris y col., 2006; Perez-Jimenez y col., 2010). En general, se observó un comportamiento similar al registrado en el resto de familias, esto es, un mayor contenido de flavonoles en los extractos etanólicos que en los acuosos, especialmente significativo para CB, GW,

PA y RI. La exposición a los rayos solares aumenta 10 veces la presencia de esta familia (Makris y col., 2006), por lo que vuelve a remarcarse el efecto de la heterogeneidad de la uva en el racimo en función de su exposición solar, que se puso de manifiesto en algunos extractos (variedades UB, MF, FB, MR y RO).

Como ya ocurría en los acuosos, los ácidos hidroxibenzóicos se detectaron en casi todos los extractos, en cantidades entre los 0,24 mg/L para CH a los 5,59 mg/L de MR. Estos resultados coinciden con los encontrados en vinos blancos (Landrault y col., 2001) para aquellas variedades cuyos contenidos en este tipo de compuestos fue superior a 1 mg/L. Asimismo, mientras que para algunas variedades el contenido en este tipo de compuestos de los extractos etanólicos fue claramente superior a los acuosos (AL, GW, MR y PA), en otras no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de extractos.

Se observó la presencia de ácidos hidroxicinámicos en los extractos etanólicos de 10 variedades distintas, cuyos contenidos variaban entre los 0,02 mg/L de XA y los 0,73 mg/L de RI. Estas cantidades son algo inferiores a las descritas bibliográficamente (Anastasiadi y col., 2010; Landrault y col., 2001; Pérez-Jiménez y col., 2010).

Asimismo, los estilbenos se encontraron únicamente en los 5 extractos etanólicos procedentes de las variedades AL, FB, GW, RI y XA con contenidos entre los 0,06 mg/L de XA y los 1,4 mg/L de GW y AL, coincidiendo estas concentraciones con la bibliografía (Anastasiadi y col., 2010, Fernández-Mar y col., 2012; Gonzalez-Barrio y col., 2006; Landrault y col., 2002). Estos valores resultaron bajos respecto a los encontrados en otros estudios, donde el empleo de uvas atacadas por hongos procedentes de zonas húmedas, o expuestas a la acción de radiación UV produjo un aumento en el contenido en este tipo de compuestos. En este sentido, tal y como se ha comentado en la introducción, los estilbenos son biosintetizados por la planta en respuesta a condiciones de estrés (ataques fúngicos y radiación UV), localizándose principalmente en los hollejos y semillas de los granos de uva (Jeandet y col., 1991; Langcake y col., 1976). Cabe destacar el comportamiento de las variedades FB y RI cuyos extractos etanólicos fueron significativamente diferentes a los acuosos, que no contenían estilbenos, lo que pone de manifiesto el posible interés

del empleo de los hollejos de determinadas variedades durante el proceso de vinificación de las mismas.

La suma de los compuestos fenólicos analizados por HPLC-PAD se recoge en la Figura 4.17 y en la Tabla A.6 del Anexo. Para los extractos acuosos los contenidos se situaron entre los 0,07 mg/L de MA y los 74 mg/L de RO, mientras que en los etanólicos variaron entre los 5 mg/L de MC y los 128 mg/L de AL. Estas cantidades son inferiores a las descritas en la bibliografía que sitúan el contenido total de un vino blanco alrededor de 150-400 mg/L en vinos blancos en consonancia con la distinta metodología empleada para su determinación (García-Ruiz y col., 2007, Anastasiadi y col., 2010, Dávalos y col., 2005, Cantos y col., 2002a). En este sentido, hay que tener en cuenta que en los estudios anteriormente citados, el contenido total de compuestos fenólicos se determinó haciendo uso del método del reactivo de Folin-Ciocalteu, y por tanto, se corresponde con la suma de monómeros, oligómeros y polímeros presente en las muestras analizadas.

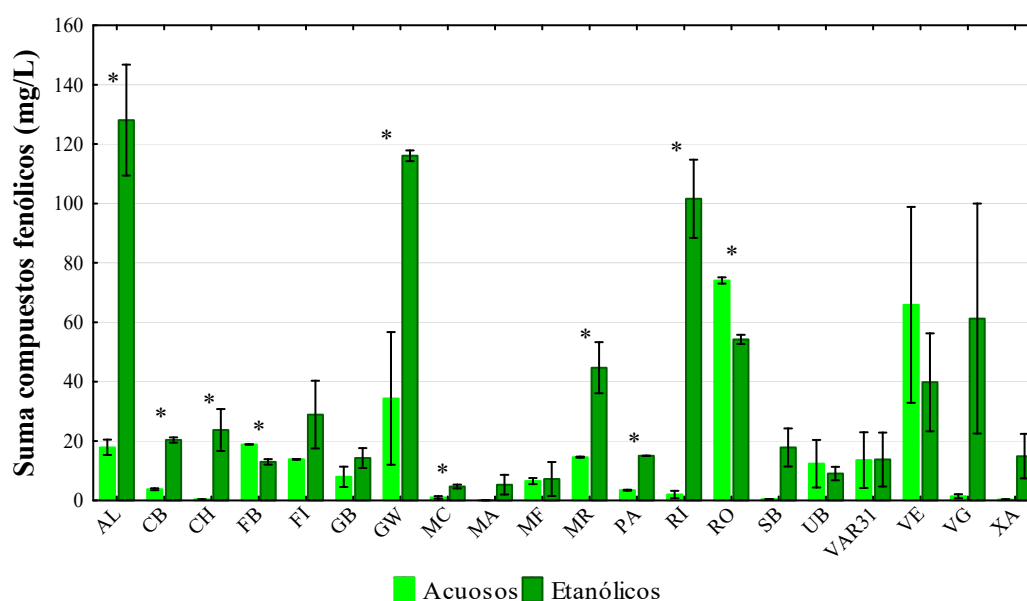


Figura 4.17. Comparación entre la suma de compuestos fenólicos de los extractos acuosos y la de los etanólicos de uva blanca.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$) entre extractos acuosos y etanólicos dentro de una misma variedad.

En los extractos acuosos de las variedades RO, VE y GW se detectaron los mayores contenidos de compuestos fenólicos, mientras que MC, MA, XA, CH y SB, fueron las variedades que dieron lugar a los extractos más pobres en ellos.

Respecto a los extractos etanólicos, las variedades AL, CB, CH, GW, MC, MR, PA y RI, presentaron mayores contenidos de compuestos fenólicos que sus correspondientes acuosos, mientras que en los extractos acuosos de FB y RO fueron superiores, contrariamente a lo esperable, debido posiblemente a la heterogeneidad de los granos de uva medidos. Nuevamente, se observó una posible correlación entre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos etanólicos. De esta manera, las variedades con un mayor contenido en compuestos fenólicos fueron AL, GW, RI y VG, mientras que los menores valores correspondieron nuevamente a MA y MC junto a MF, de manera semejante a la actividad antioxidante detectada en ellas.

De esta manera, estos resultados invitaron a profundizar en la posible correlación existente entre la actividad antioxidante y la composición fenólica medida, tanto a nivel general como a nivel de familias de compuestos, lo que podría dilucidar la posible contribución de cada una de estas familias fenólicas en la actividad antioxidante de los extractos y, de esta manera, investigar posibles estrategias de cara a un aumento en el contenido de la familia de compuestos más interesantes para la elaboración de bebidas más saludables.

Con este fin, se llevó a cabo el estudio de la correlación existente entre la composición fenólica y el valor TEAC de los extractos. Este estudio se realizó de manera independiente por cada tipo de extracto, acuoso o etanólico.

Aunque previamente se había observado una alta correlación entre la actividad antioxidante y el IPT de los extractos acuosos de uvas blancas, no se observó ninguna correlación significativa entre la suma de compuestos fenólicos (cuantificados por HPLC-PAD) y el valor TEAC de los mismos ($p = 0,0657$) (Figura 4.18). Este hecho podría ser debido a la dispersión producida por ciertas variedades como VE o RI o a la presencia de otros compuestos fenólicos distintos a los cuantificados en este estudio. Hay que tener en cuenta que, tal y como ya se ha señalado, los monómeros (compuestos analizados por HPLC-PAD) no son los únicos compuestos fenólicos presentes en la matrices vínicas. De esta manera, se ha demostrado que los oligómeros y los polímeros fenólicos también contribuyen a la actividad antioxidante de dichas matrices (Makris y col., 2007; Karvela y col., 2011).

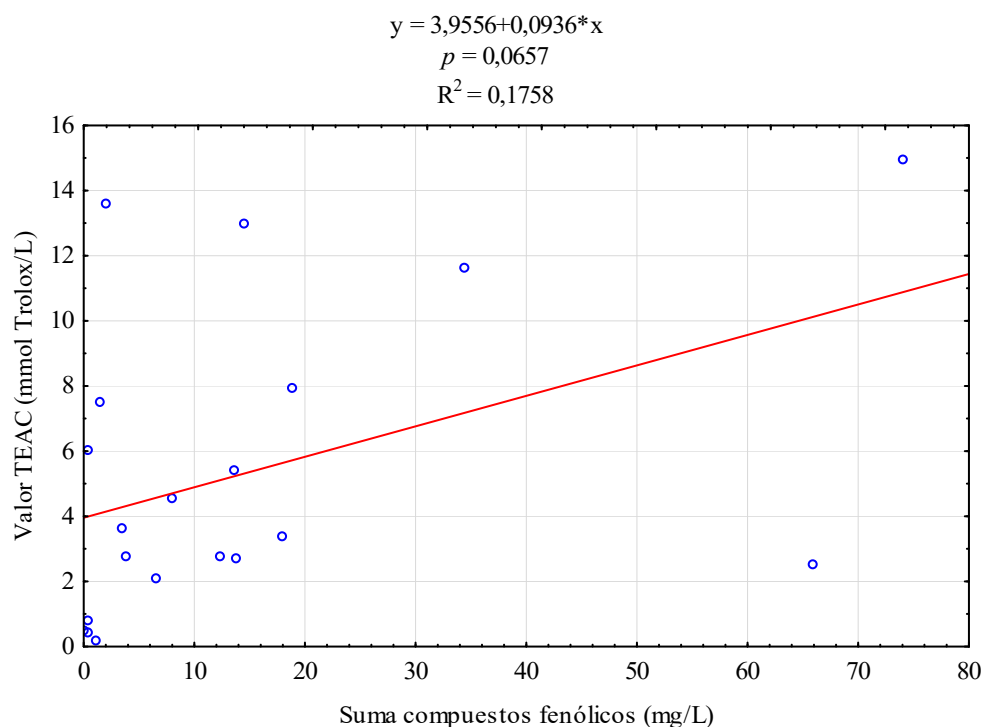


Figura 4.18. Correlación entre el valor TEAC y la suma de compuestos fenólicos en los extractos acuosos.

Centrándonos en la fracción monomérica analizada, es posible que la relación entre esta fracción y la actividad antioxidante no se corresponda con un polinomio con coeficientes iguales para cada familia de compuestos fenólicos, (*valor TEAC* = $A + B \times ([\text{flavanoles}] + [\text{flavonoles}] + [\text{ácidos hidroxibenzóicos}] + [\text{ácidos hidroxicinámicos}] + [\text{estilbenos}])$), sino que la contribución de cada familia a la actividad antioxidante del extracto sea distinta, representada con una ecuación tipo: $\text{valor TEAC} = A + B \times [\text{flavanoles}] + C \times [\text{flavonoles}] + D \times [\text{ácidos hidroxibenzóicos}] + E \times [\text{ácidos hidroxicinámicos}] + F \times [\text{estilbenos}]$ coincidiendo con los resultados de otros investigadores que pusieron de manifiesto la influencia heterogénea de todas o ciertas familias de compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de los extractos estudiados (Fernández-Pachón y col., 2006; Horax y col., 2010; Makris y col., 2006).

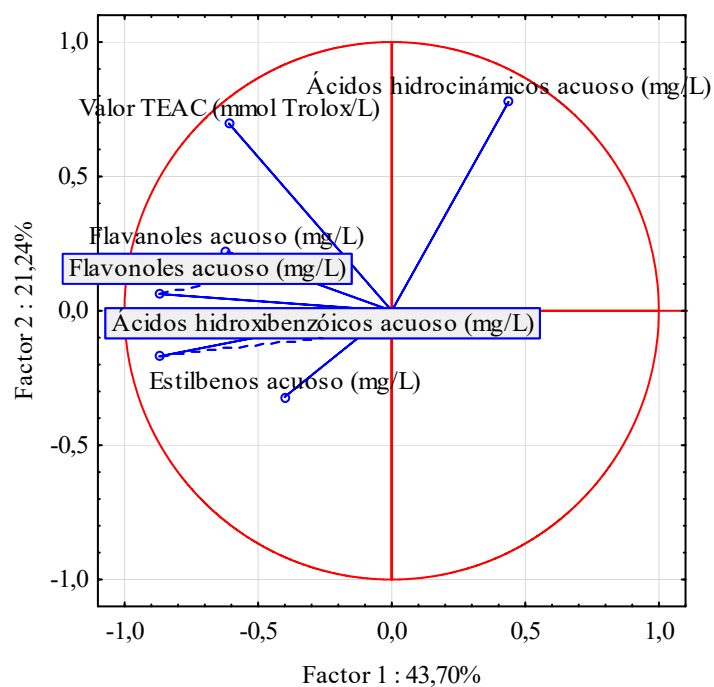
Con este objetivo, se llevó a cabo un análisis de componentes principales para averiguar qué familias ejercían una mayor influencia en la actividad antioxidante de los extractos. El análisis en los extractos acuosos, según se muestra en la Tabla 4.3., muestra que con 3 factores se explica el 82% de la varianza acumulada.

Tabla 4.3. Análisis de componentes principales de los extractos acuosos de variedades uvas blancas.

| Factores | Valor propio | Varianza total (%) | Valor propio acumulado | Varianza acumulada (%) |
|----------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 2,6 | 43,7 | 2,6 | 43,7 |
| 2 | 1,3 | 21,2 | 3,9 | 64,9 |
| 3 | 1,0 | 17,3 | 4,9 | 82,2 |
| 4 | 0,6 | 10,6 | 5,6 | 92,8 |
| 5 | 0,3 | 5,4 | 5,9 | 98,3 |
| 6 | 0,1 | 1,7 | 6,0 | 100,0 |

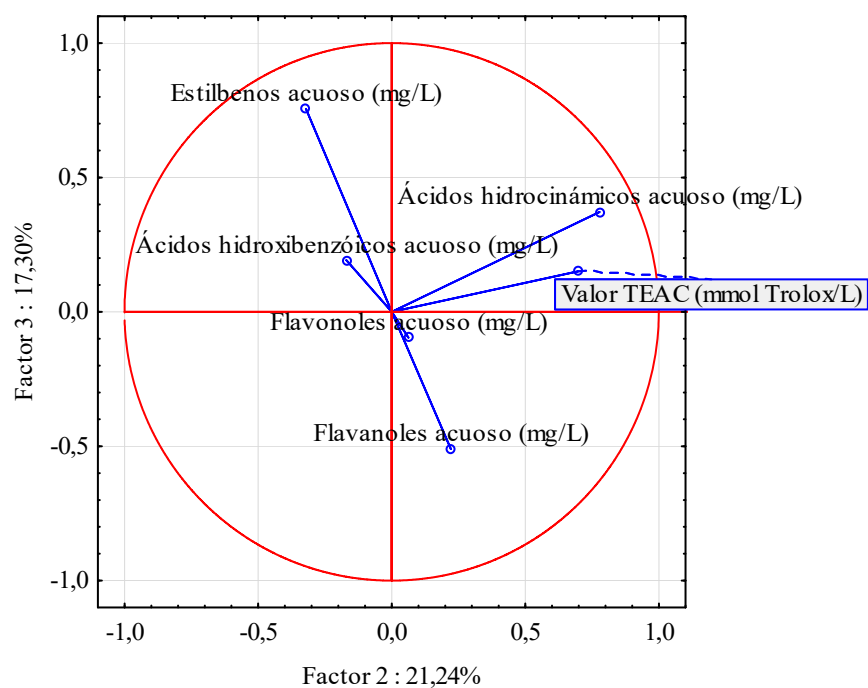
Si se representan los tres factores principales respecto a las variables estudiadas, se observa que el valor TEAC acuoso, junto con el contenido en ácidos hidroxicinámicos son las principales variables que definen los factores 1 y 2 (que explican el mayor porcentaje de la varianza, 64%) (Figuras 4.19 y 4.20), mientras que el factor 3 apenas guarda relación con el valor TEAC, mientras que sí se encuentra relacionado con los estilbenos y ácidos hidroxibenzóicos (Figura 4.20). De esta manera se puede decir que el valor TEAC de los extractos acuosos de uva blanca se correlaciona fundamentalmente con los flavanoles y flavonoles (Figura 4.19) y en menor medida con los ácidos hidroxicinámicos (Figura 4.20). Para facilitar la lectura de los nombres de las familias, algunas se han desplazado y aparecen recuadradas en el gráfico.

A continuación se llevó a cabo un estudio de regresión múltiple para determinar la contribución de cada una de las familias de compuestos fenólicos en el valor TEAC de los extractos acuosos. En este caso se vio que las varianzas ajustadas eran, en el mayor de los casos, del 60% (datos no mostrados), lo que indica que es necesario aumentar la robustez de la correlación, con un mayor número de muestras analizadas.



○ Familia de compuestos fenólicos

Figura 4.19. Proyección de las familias de compuestos acuosos de uva blanca, en el plano de los factores 1 y 2 en el análisis de componentes principales (ACP).



○ Familia de compuestos fenólicos

Figura 4.20. Proyección de las familias de compuestos acuosos de uva blanca, en el plano de los factores 2 y 3 en el ACP.

Por su parte, en el caso de los extractos etanólicos sí se observó una correlación significativa ($p = 0,0005$) entre la suma de compuestos fenólicos y el valor TEAC (Figura 4.21), lo que indica el distinto comportamiento entre ambos tipos de extractos. Este comportamiento parece estar relacionado con el distinto perfil y mayor contenido en compuestos fenólicos individuales (Dávalos y col., 2005).

Por tanto, a partir de la suma de compuestos fenólicos se puede deducir el valor TEAC que le correspondería a un determinado extracto aunque el error cometido seguiría siendo elevado (50% de probabilidad de dar un dato erróneo; $\text{error} = (1-r^2)*100$) (Figura 4.21). De esta manera, a una suma de compuestos fenólicos nula le corresponde un valor TEAC positivo, lo que estaría relacionado con la existencia en el extracto etanólico de compuestos no identificados que influirían en la actividad antioxidante de los mismos (Karvela y col., 2011; Nieto, 2015).

En el estudio de las familias muestran una mayor influencia en el valor TEAC de los extractos etanólicos, se realizó un análisis de los componentes principales, tal y como se ha llevado a cabo para los extractos acuosos, donde se observa que para los extractos etanólicos los 3 primeros factores explicaban el 86% de la varianza acumulada (Tabla 4.4).

Como se observa en las proyecciones de las variables respecto a los tres factores principales, el valor TEAC de los extractos etanólicos se encuentra relacionado principalmente con el factor 1, y en menor medida con los factores 3 y 2; mientras que las distintas familias de compuestos fenólicos se encuentran relacionadas con los tres factores. Por otra parte, se observa que todas las familias de compuestos analizadas ejercen una cierta influencia sobre el valor TEAC, aunque no en la misma medida. De esta manera, los flavanoles y los ácidos hidroxibenzóicos, junto con los estilbenos y los flavonoles son las familias de compuestos fenólicos que ejercen una mayor influencia en el valor TEAC de los extractos (Figura 4.22), y en menor medida los ácidos hidroxicinámicos (Figuras 4.22 y 4.23).

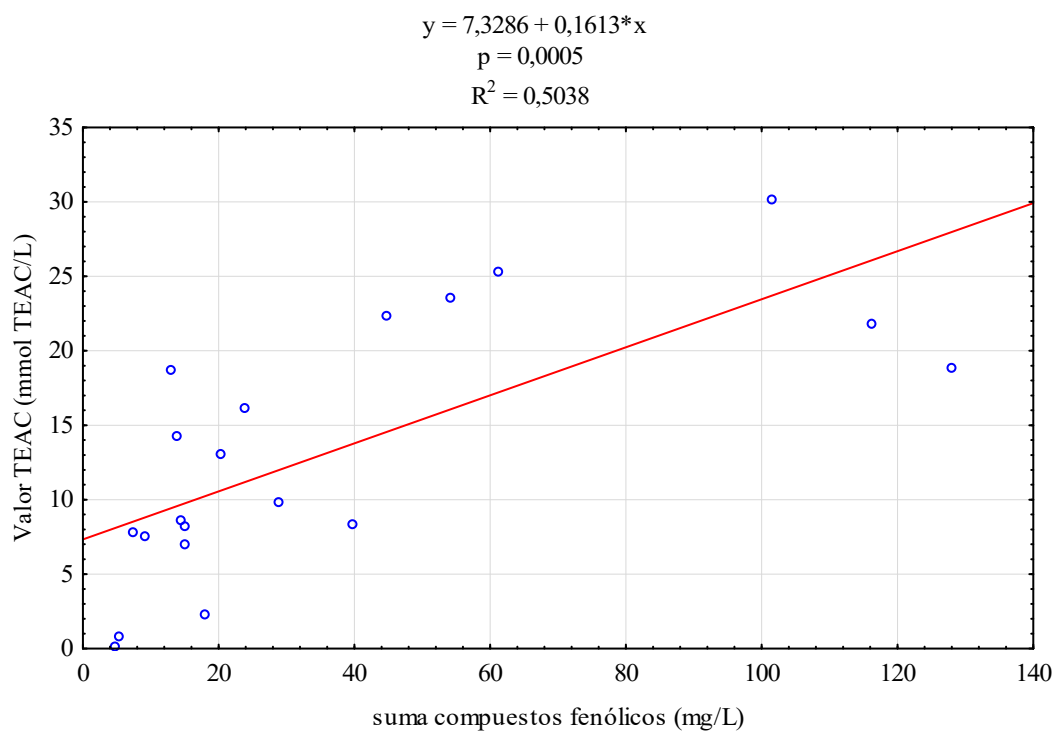
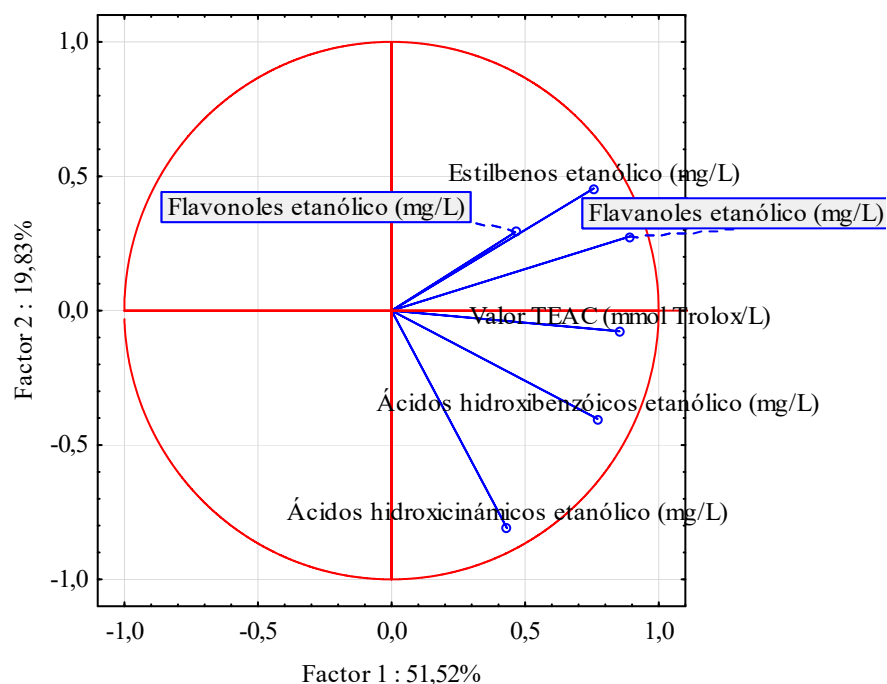


Figura 4.21. Correlación entre el valor TEAC y la suma de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos, significativa si $p \leq 0,05$.

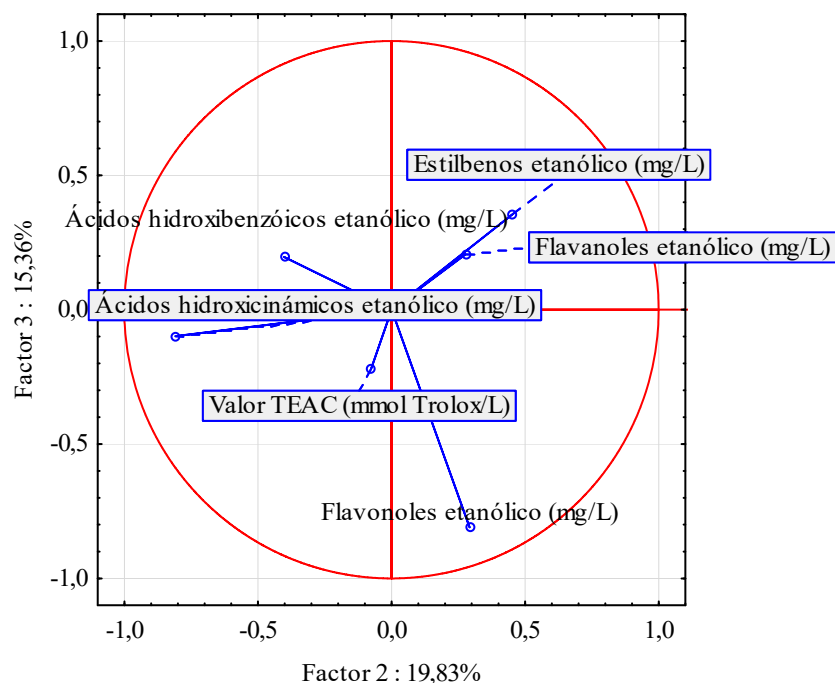
Tabla 4.4. Análisis de componentes principales de los extractos etanólicos de variedades uvas blancas.

| Factores | Valor propio | Varianza total (%) | Valor propio acumulado | Varianza acumulada (%) |
|----------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 3,1 | 51,5 | 3,1 | 51,5 |
| 2 | 1,2 | 19,8 | 4,3 | 71,4 |
| 3 | 0,9 | 15,4 | 5,2 | 86,7 |
| 4 | 0,4 | 6,7 | 5,6 | 93,4 |
| 5 | 0,3 | 4,8 | 5,9 | 98,2 |
| 6 | 0,1 | 1,8 | 6,0 | 100,0 |



○ Familias de compuestos fenólicos

Figura 4.22. Proyección de las familias de compuestos etanólicos de uva blanca, en el plano de los factores 1 y 2 en el análisis de componentes principales.



○ Familias de compuestos fenólicos

Figura 4.23. Proyección de las familias de compuestos etanólicos de uva blanca, en el plano de los factores 2 y 3 en el análisis de componentes principales.

Una vez analizado el comportamiento de los extractos acuosos y etanólicos, se puede deducir que los flavanoles y los flavonoles influyen positivamente en la actividad antioxidante, tanto en extractos acuosos como etanólicos de uvas blancas; mientras que los ácidos hidroxicinámicos lo hicieron en los acuosos y los ácidos hidroxibenzóicos y estilbenos en los etanólicos y en menor medida en los acuosos (Fernández-Pachón y col., 2006; Gorjanovic y col., 2010; Katalinic y col., 2004).

Vistos todos los resultados anteriores, como conclusión de este capítulo dedicado a las uvas blancas, se puede decir que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las mismas, está relacionada con el contenido total en compuestos fenólicos, así como con la presencia de ciertas familias de los mismos. En este sentido, la maceración con hollejos y el alcohol ejerce una clara influencia en la cantidad y tipo de compuesto fenólico presente en los extractos y en la actividad antioxidante de los mismos. Así, mientras que los flavanoles y flavonoles, junto con los ácidos hidroxicinámicos ejercen una clara influencia en el valor TEAC de los extractos acuosos, en los extractos etanólicos son los flavanoles junto con los ácidos hidroxibenzóicos los que ejercen una mayor influencia, seguidos de los estilbenos y los flavonoles. En este sentido, sería necesario realizar un estudio más profundo (con un mayor número de variedades y el análisis de una mayor cantidad de compuestos fenólicos) para conseguir dilucidar el papel desempeñado por cada una de las familias de compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.

Por otro lado, los extractos obtenidos a partir de las variedades RO, GW, RI y en menor medida VG y AL mostraron los mayores contenidos en los compuestos analizados por HPLC-PAD, en consonancia de manera general con los valores obtenidos en la medida de la actividad antioxidante (determinada por ambos métodos). De esta manera, dichas variedades se postulan como las más interesantes de cara a la obtención de un vino blanco, tanto sometido a un proceso macerativo como sin él, con un alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes.

4.1.2. Uvas tintas

4.1.2.1. Medida de la actividad antioxidante

Como se ha puesto de manifiesto en el estudio dedicado a las uvas blancas, la variedad de uva, el contenido total en compuestos fenólicos, y en particular ciertas familias de compuestos fenólicos, ejercen una clara influencia en la actividad antioxidante de las bebidas obtenidas a partir de uvas. En este sentido, una vez concluido el estudio dedicado a las uvas blancas, se consideró interesante realizar este mismo estudio pero con diversas variedades de uva tinta.

Los resultados obtenidos en la medida de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del radical DPPH• de los extractos acuosos y etanólicos de las 26 variedades de uva tinta analizadas, se muestran en las Figuras 4.24, 4.25 y 4.26, y en la Tabla A.8 del Anexo.

Los valores TEAC de los extractos acuosos obtenidos a partir de uva tinta (Figura 4.24) oscilaron entre 0,96 mmol Trolox/L para CI y 25,41 mmol Trolox/L para VAR30, aunque para la mayoría de las variedades se situaron en torno a 3-5 mmol Trolox/L. Asimismo, según se deduce del análisis estadístico nos encontramos dentro de una matriz bastante heterogénea respecto a su actividad antioxidante.

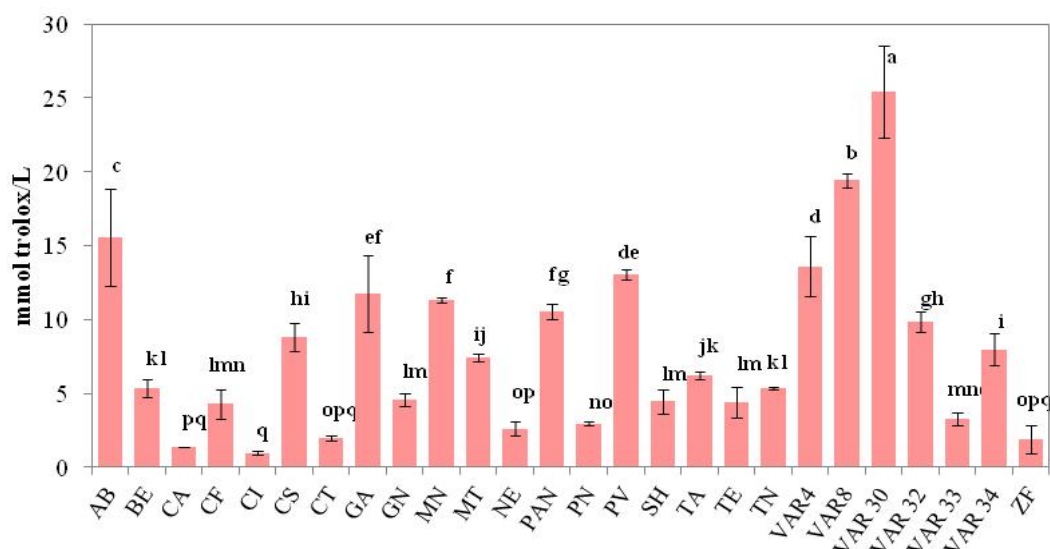


Figura 4.24: Valor TEAC de los extractos acuosos de uva tinta.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Entre los extractos con mayor valor TEAC destacan los obtenidos a partir de las variedades ancestrales VAR30, VAR8 y VAR4, junto con AB y PV, por lo que se

puede intuir que podrían ser aptas para la elaboración de un vino rosado con alta capacidad antioxidante.

Por su parte, la mayor capacidad antioxidante de los extractos etanólicos se detectó nuevamente en el procedente de la VAR30 (Figura 4.25) (41 mmol Trolox/L), mientras que la menor correspondió nuevamente a CI (5,42 mmol Trolox/L). En la bibliografía se ha encontrado una gran variabilidad respecto al valor TEAC de los vinos tintos. De esta manera, Alonso y col., 2002) encontraron valores cerca de los 7,5 mmol Trolox/L, mientras que otros estudios han descrito valores próximos a 14 mmol Trolox/L (de Beer y col., 2002), o entre 4 y 20 mmol Trolox/L de vino (Fernández-Pachón y col., 2004; Kondrashov y col., 2009; Serunga y col., 2011) para variedades tintas. En este sentido, el promedio del valor de TEAC de los extractos etanólicos obtenido en el presente estudio fue de 16 mmol Trolox/L coincidiendo con los valores encontrados en los anteriores estudios.

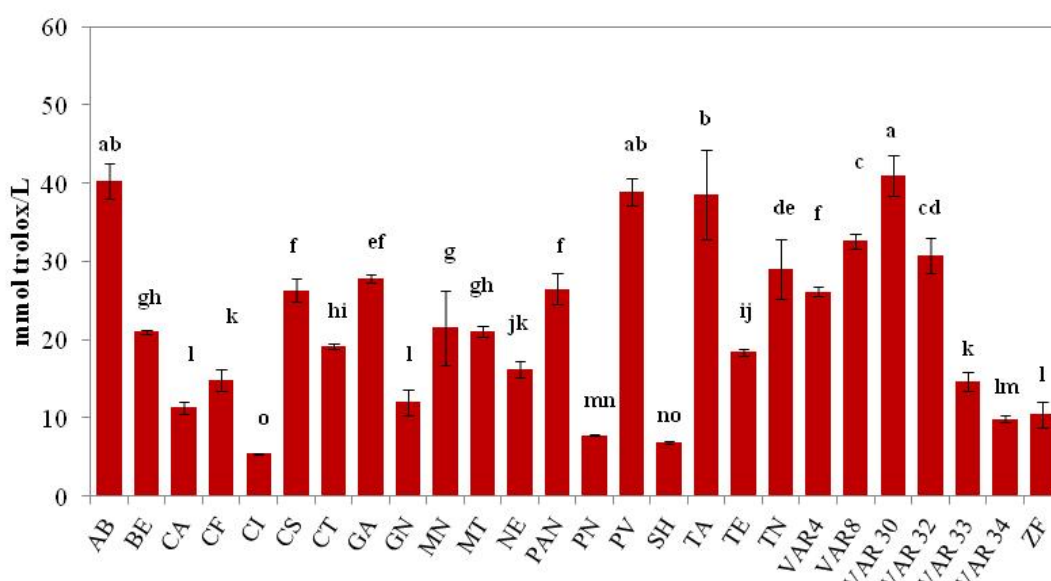


Figura 4.25: Valor TEAC (mmol Trolox/L) de los extractos etanólicos de uva tinta.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para este tipo de extractos, las variedades AB, PV, TA, VAR8, VAR32, junto con la anteriormente mencionada VAR30, dieron lugar a los extractos más antioxidantes con valores TEAC superiores a 30 mmol Trolox/L. Por otro lado, los extractos procedentes de las variedades CI, SH y PN mostraron la actividad más baja (Kondrashov y col., 2009; Šeruga y col., 2011; Stratil y col., 2008). Hay que destacar

que la maceración con etanol al 12% provocó un aumento en el valor TEAC de todas las variedades de uva tinta estudiadas (Figura 4.26). Sin embargo, tal y como ocurría en los extractos procedentes de uvas blancas, no se registró el mismo aumento en el valor TEAC en unas variedades que en otras, aunque el comportamiento entre las uvas tintas fue más homogéneo. En este sentido, la maceración de los hollejos en presencia de un 12% de etanol provocó un aumento importante de la actividad antioxidante en las variedades TA, CA, CF, CT y TN, mientras que en otras como AB, GA, VAR4, VAR8 y VAR30 el incremento fue más moderado. Este comportamiento podría estar relacionado con el grado de madurez, estructura celular o composición química de los racimos de uva dentro de cada variedad, lo que daría lugar, por ejemplo, a una mayor eficiencia de extracción en uvas más maduras (Ribéreau-Gayon y col., 2000; Gonzalez-Barrio y col., 2006).

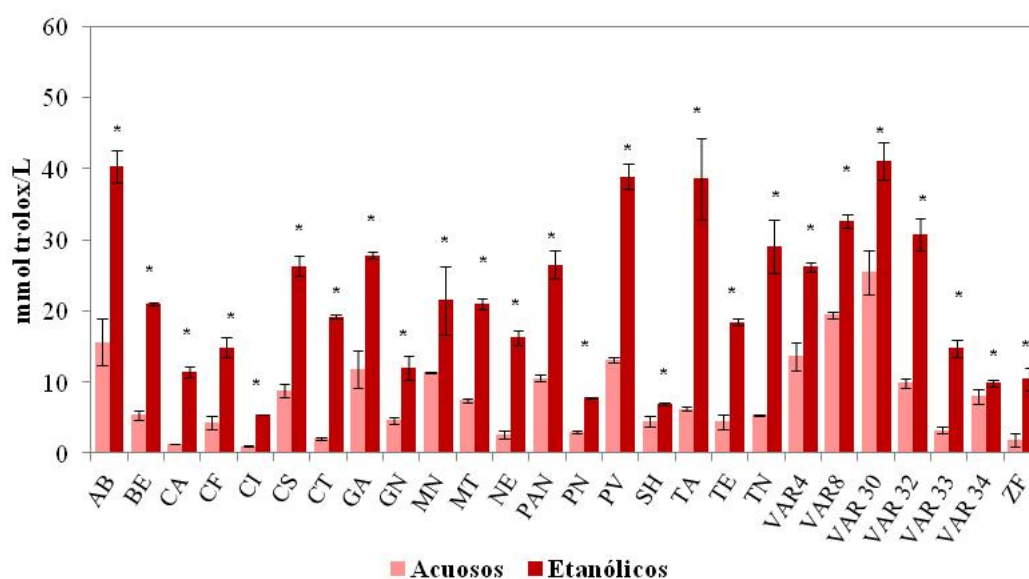


Figura 4.26: Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de uva tinta.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

Por otro lado, la actividad antioxidante (%AA) (método del blanqueamiento del β -caroteno) de los extractos procedentes de uva tinta se evaluó del mismo modo que se hizo con las variedades blancas aunque se aplicaron mayores diluciones de los extractos (dilución 1/5, dilución 1/10 y dilución 1/20). Los resultados obtenidos se encuentran reflejados en la Tabla A.9 y A.10 del Anexo. Siguiendo el mismo

comportamiento que en las variedades blancas, se observó, en todos los casos, una disminución en el porcentaje de actividad antioxidante al aumentar la dilución del extracto. Nuevamente y con el fin de facilitar la comparación de los extractos, en la Figura 4.27 únicamente se reflejan los porcentajes de actividad obtenidos para la dilución 1/10 de la muestra del extracto acuoso.

Tal y como ya ocurriera para el valor TEAC los resultados obtenidos fueron bastante heterogéneos (Figura 4.27), como pone de manifiesto la existencia de 10 grupos estadísticamente distintos. Las variedades, AB, CS y VAR30, junto con MN, MT, PV y VAR32, consiguieron llegar a valores superiores al 90% de AA. Por el contrario, CF, CI y ZF, no llegaron al 60% de AA.

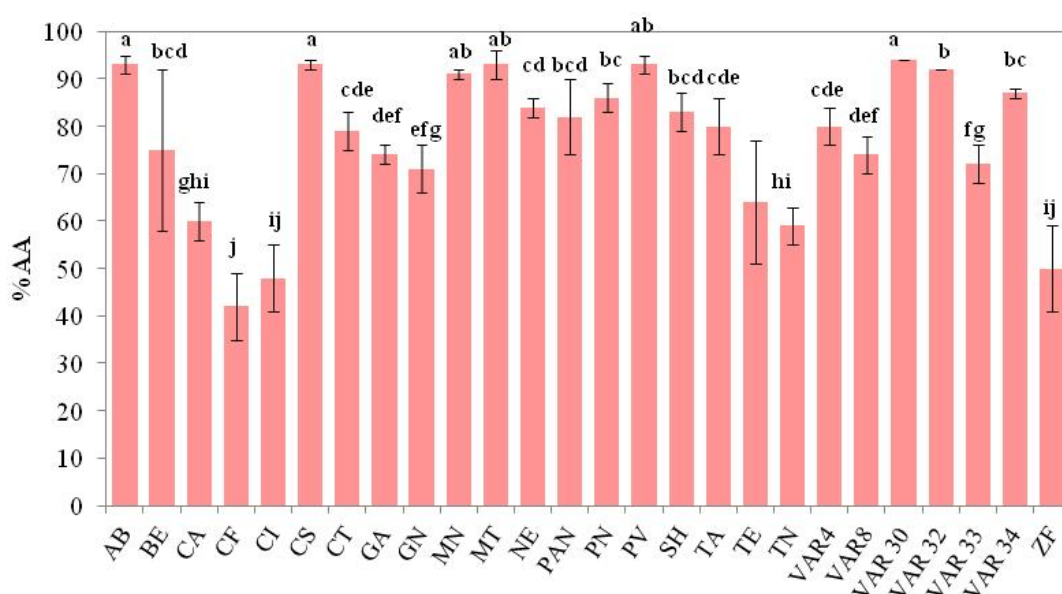


Figura 4.27: Actividad Antioxidante (%) de los extractos acuosos de uva tinta (dilución 1/10).

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Cuando se midió la correlación entre los dos métodos de medida de la actividad antioxidante (Figura 4.28) se observó que ésta era significativa ($p \leq 0,05$) aunque con un coeficiente de correlación relativamente bajo, lo que implica un alto grado de error al intentar calcular una actividad a partir de la otra.

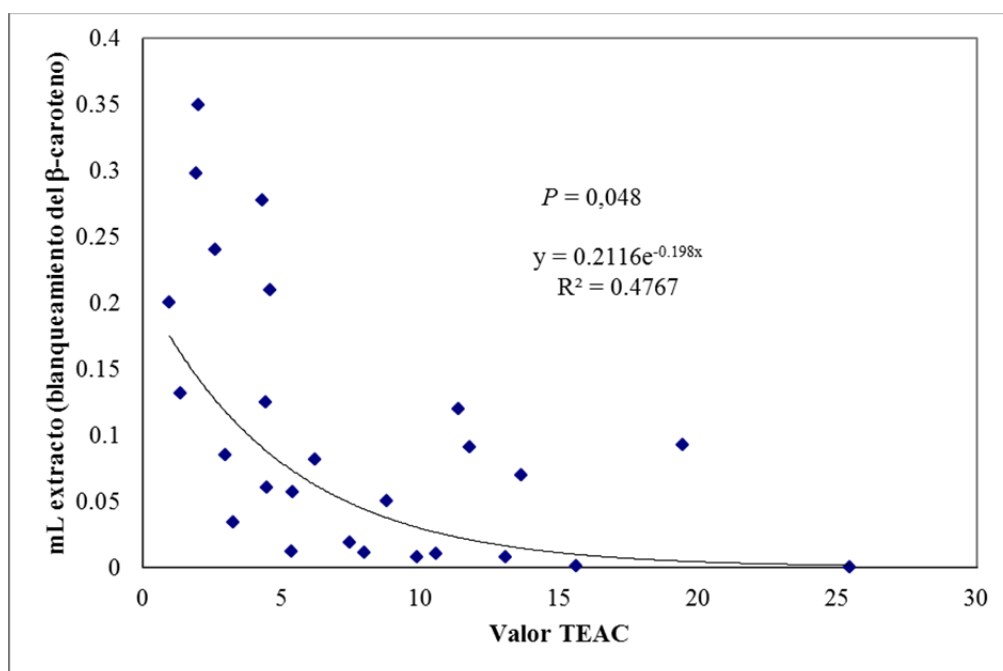


Figura 4.28. Correlación entre la actividad antioxidante de ambos métodos de los extractos acuosos de uvas tintas.

Respecto a los extractos etanólicos, las variedades que proporcionaron una mayor capacidad de captación de radicales peroxilo fueron las ancestrales VAR30 y VAR32, junto con PV, TA, VAR4 y VAR8 (Figura 4.29). En contraposición, los extractos procedentes de GN mostraron la menor actividad, seguidas de CI y las variedades ancestrales VAR33 y VAR34. En general, los resultados se mostraron más homogéneos que en los extractos acuosos, seguramente influenciados por el alto porcentaje de AA de los extractos etanólicos independientemente de la variedad analizada.

En este caso, la correlación entre ambos métodos de actividad antioxidante también resultó significativa ($p \leq 0,05$) pero, nuevamente, con un bajo coeficiente de determinación (Figura 4.30), lo que indicaba un comportamiento más desigual de los extractos respecto al método de actividad antioxidante utilizado.

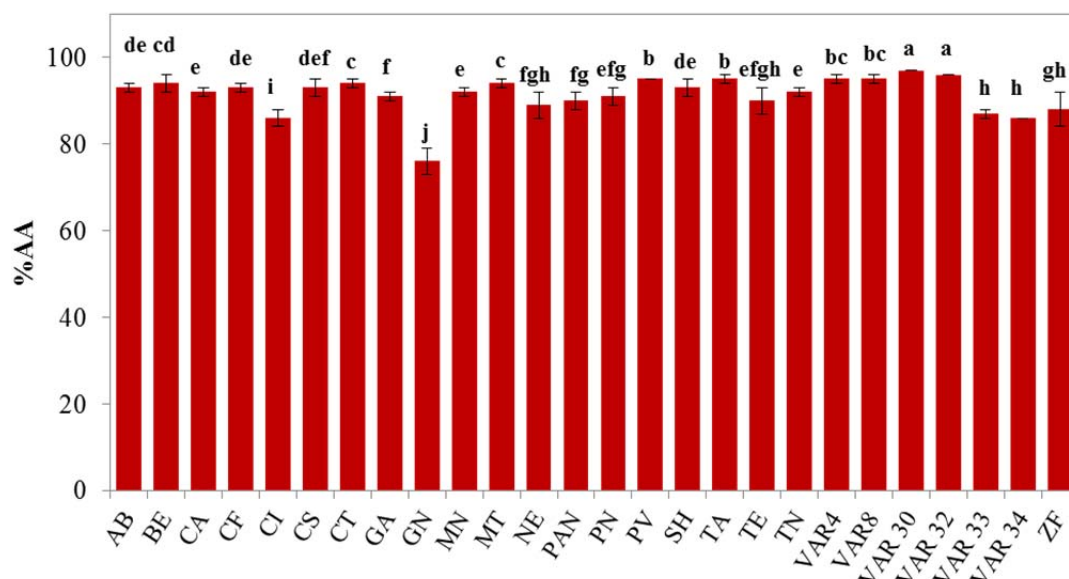


Figura 4.29: Actividad Antioxidante (%) de los extractos etanólicos de uva tinta (dilución 1/10).

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

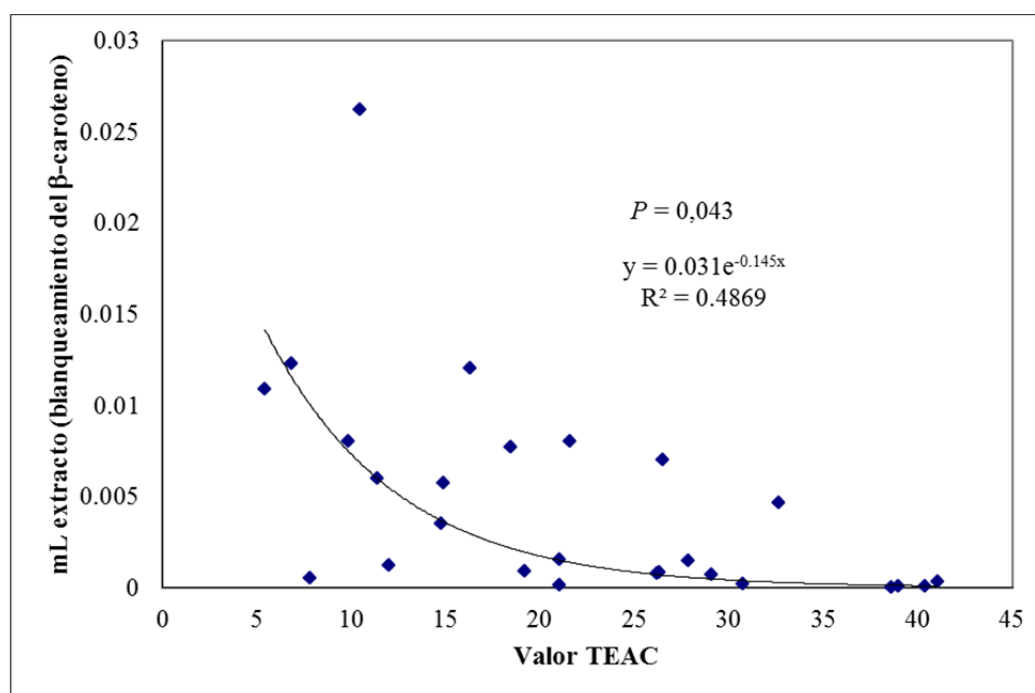


Figura 4.30. Correlación entre la actividad antioxidante de ambos métodos de los extractos etanólicos de uvas tintas.

Por último, en la comparación entre ambos tipos de extractos se observó que, en general, los etanólicos fueron significativamente más activos que sus

correspondientes acuosos, respecto a la metodología del blanqueamiento del β -caroteno (dilución 1/10) (Figura 4.31). Como se acaba de mencionar el porcentaje de actividad antioxidante de esos extractos es muy alto, tanto para los extractos acuosos como para los etanólicos, lo que daría lugar a que, en algunos casos, no se observara una diferencia clara entre ambos tipos de extractos, mientras que sí se observaban en el caso de la metodología DPPH[•].

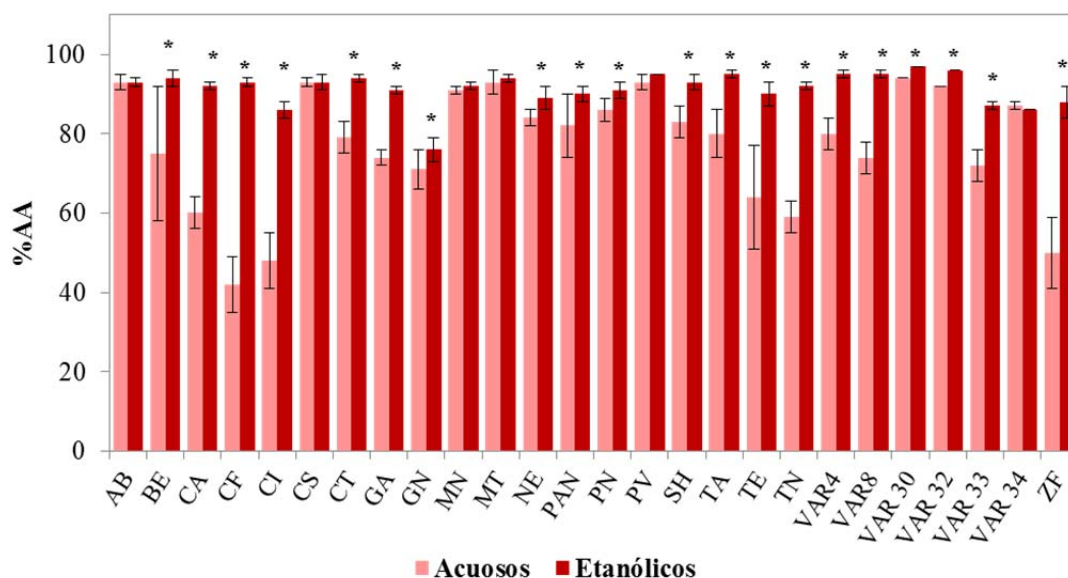


Figura 4.31: Comparación de la Actividad Antioxidante (%) de los extractos acuosos y etanólicos de uva tinta.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

4.1.2.2. Análisis de la composición fenólica

Determinación de los compuestos fenólicos totales

Tal y como se ha comentado anteriormente, el IPT, medido como absorbancia a 280 nm en los extractos, proporciona una idea global del contenido en compuestos fenólicos de una determinada muestra líquida.

Los valores del IPT correspondientes a los extractos acuosos procedentes de variedades tintas (Figura 4.32) mostraron una gran variabilidad entre ellos. Así, en el análisis estadístico se obtuvieron 13 grupos de muestras distintos. Los extractos procedentes de las variedades VAR30, AB, MT y VAR8 mostraron los mayores IPT con valores superiores a 50, donde el máximo fue detectado en la variedad ancestral

VAR30 (76,4). Por otro lado, BE y CI, protagonizaron los valores menores, con 3,2 y 4,0 respectivamente.

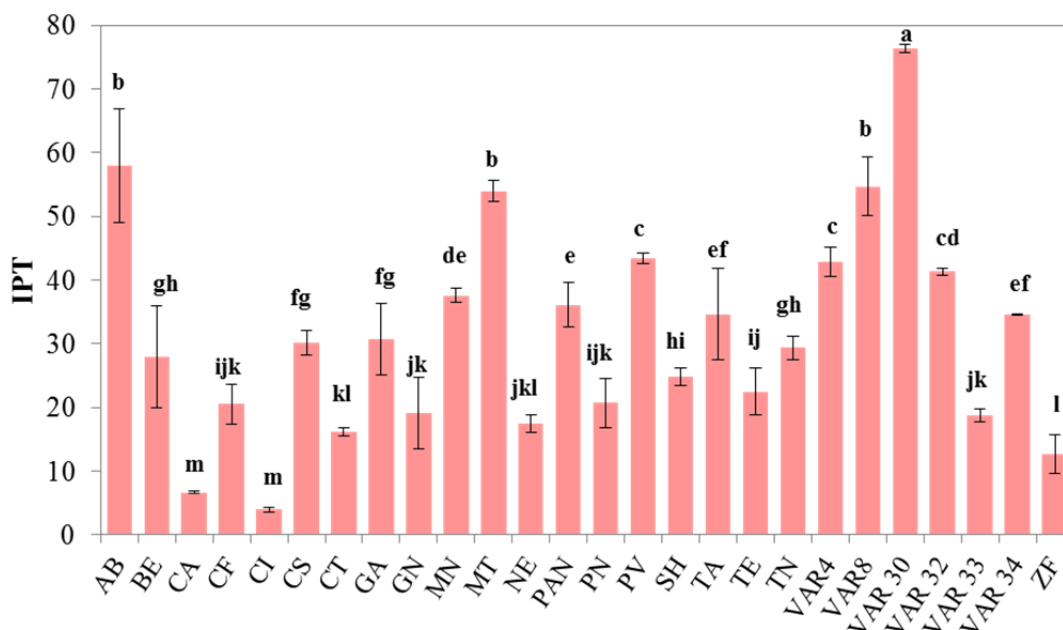


Figura 4.32: IPT de los extractos acuosos de uva tinta.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Estos valores se encuentran en consonancia con los mostrados por otros estudios en relación con variedades utilizadas en esta memoria como TE, CS y MT, entre otras (Guendez y col., 2005; Llaudy y col., 2005).

Como era de esperar el valor TEAC estaba estrechamente relacionado con el IPT ($p=0,008$), y la ecuación encontrada permitiría calcular el valor TEAC a partir del IPT con un error del 16% (Figura 4.33). Si se observan bien los datos representados, en realidad existen dos grupos de datos diferenciados en función de la relación entre el IPT y su correspondiente valor TEAC. De esta manera, se deduce que, en general, cuando el IPT de los extractos es alto o muy alto el valor TEAC se comporta tal y como predice la ecuación de regresión lineal propuesta (elipse granate), mientras que para extractos con valores de IPT bajos o para variedades específicas el valor TEAC resultaría subestimado (elipse verde).

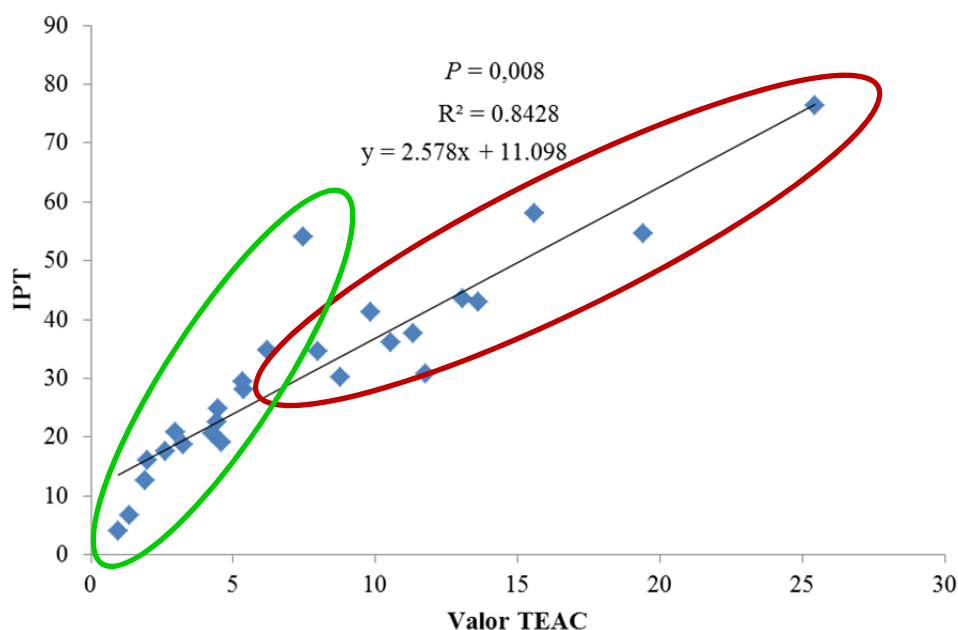


Figura 4.33: Correlación entre el IPT y el valor TEAC (mmol Trolox/L) de los extractos acuosos de uva tinta.

Para los extractos acuosos, la relación entre IPT y blanqueamiento del β -caroteno fue exponencial y significativa ($p = 0.031$) por tanto se confirma que esta actividad es debida a la presencia de compuestos fenólicos en los extractos (Figura 4.34).

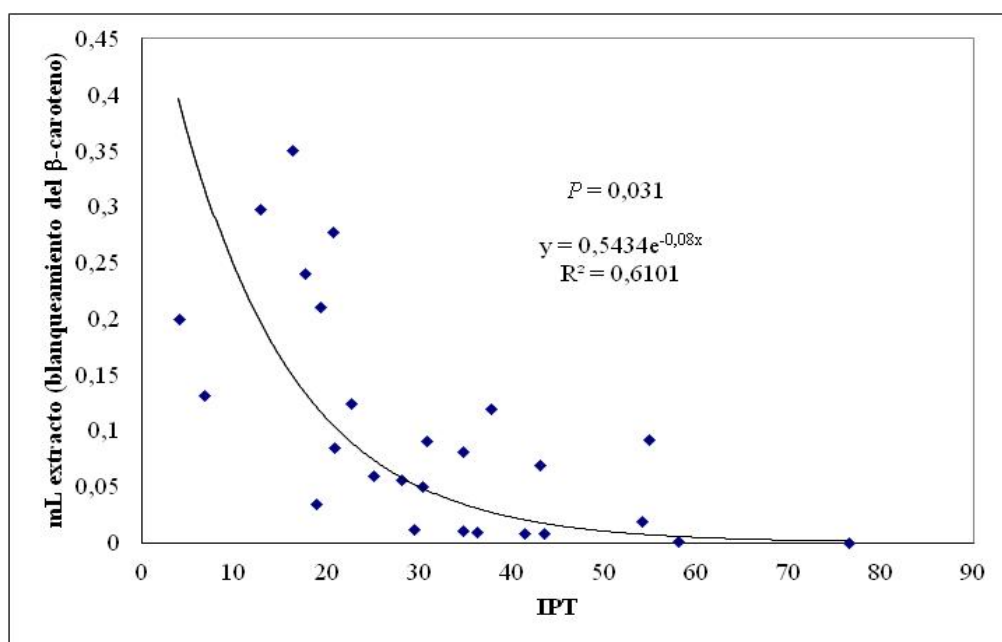


Figura 4.34. Correlación entre el IPT y el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA = 70) de los extractos acuosos de uva blanca.

Tal y como podemos observar en la Figura 4.35, a los extractos etanólicos de las variedades CI, PN y VAR3 les correspondieron los menores IPTs, con valores de 26,7, 34,6 y 34,6, respectivamente. Por el contrario, los mayores índices los proporcionaron TA (146,8) y AB (139,1).

Los resultados obtenidos son similares o ligeramente superiores a los encontrados en otros estudios, donde se muestran los valores IPT de mostos a mitad de fermentación de uvas maduras, vinos tintos o extractos, de las variedades TE, CS, MN, SH y MT (Llaudy y col., 2005; Romero-Cascales y col., 2005).

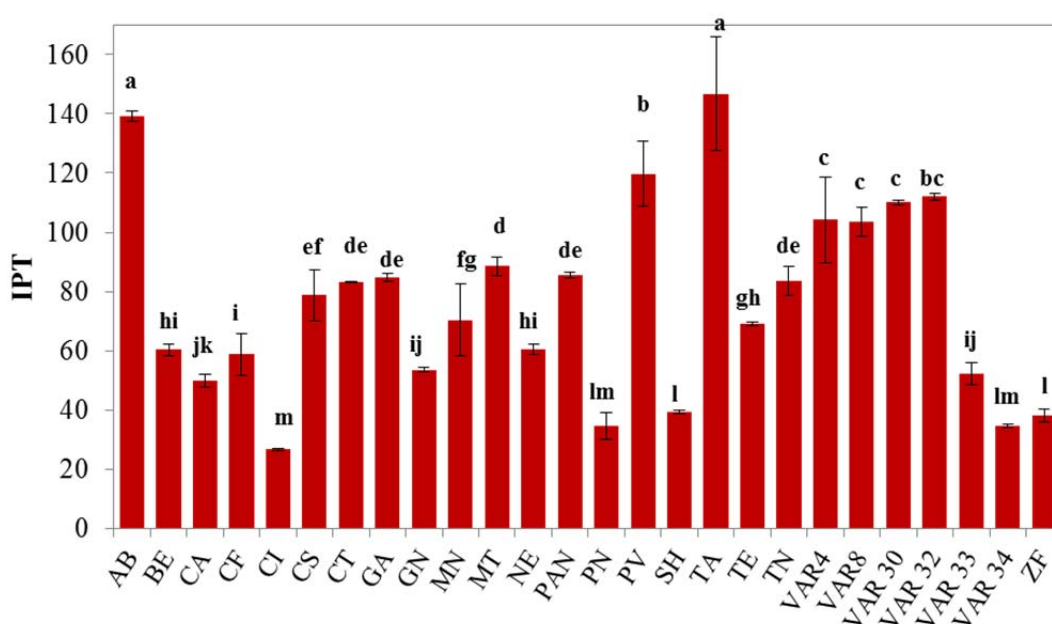


Figura 4.35: IPT de los extractos etanólicos de uva tinta.

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En cuanto a la correlación entre el contenido total en compuestos fenólicos, generalmente medido mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y expresados como mg gálico/L, y el valor TEAC de vinos tintos, son varios los estudios que han puesto de manifiesto un alto coeficiente de correlación entre ambos (Fernandez-Pachon y col., 2004; Di Majo y col., 2008; Vrèek y col., 2011), independientemente de la metodología empleada para la determinación del valor TEAC (método del radical DPPH[•], ABTS^{•+} u ORAC) y con valores similares a los encontrados en esta memoria para los extractos etanólicos de las variedades tintas, más parecidos a los esperables en un vino tinto (Figura 4.36).

Asimismo, los mL de extracto para un blanqueamiento del 70% del β -caroteno también se correlacionaron de manera significativa con el IPT (Figura 4.37) lo que confirmó la teoría de que la actividad antioxidante de los extractos etanólicos es debida principalmente a los compuestos fenólicos, aunque otros autores no llegaron a esta conclusión con el IPT, posiblemente por el escaso número de datos utilizados en el estudio de correlación (Alén-Ruiz y col., 2009).

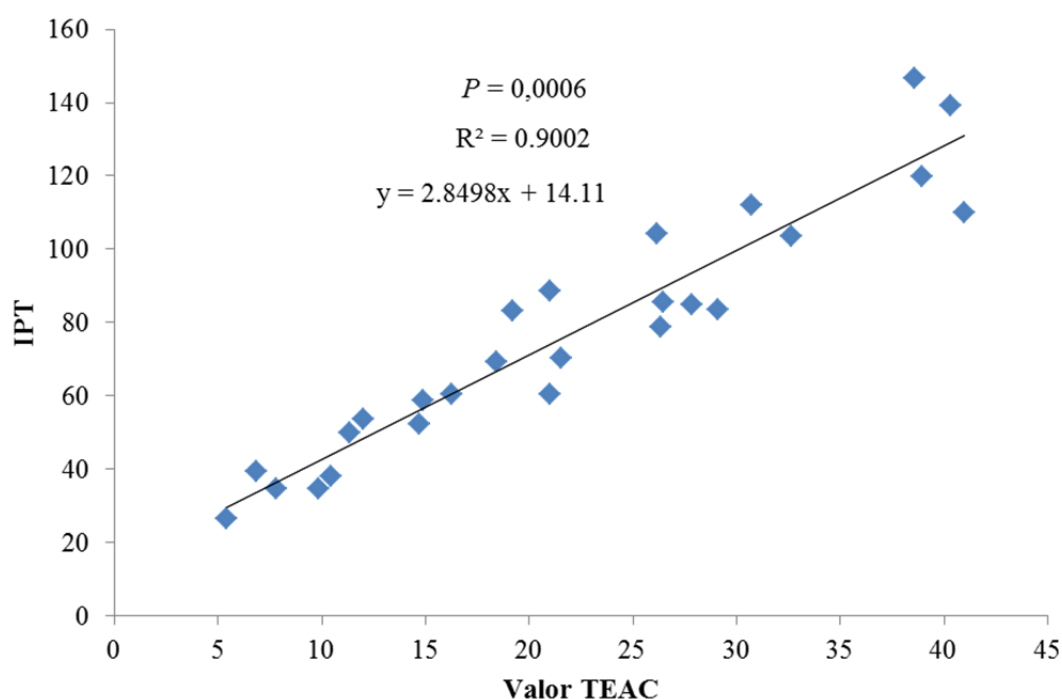


Figura 4.36: Correlación entre el IPT y el valor TEAC (mmol Trolox/L) de los extractos etanólicos de uva tinta.

Por último, en general existen diferencias significativas en el IPT de los dos tipos de extractos (Figura 4.38) en todas las variedades, excepto en VAR34. En este sentido, los extractos etanólicos permitían obtener mayores índices de IPT para variedades tintas, adquiriendo valores dos y casi tres veces más elevados que en los extractos acuosos, lo que resulta coherente con la utilización de etanol en la obtención de los extractos etanólicos.

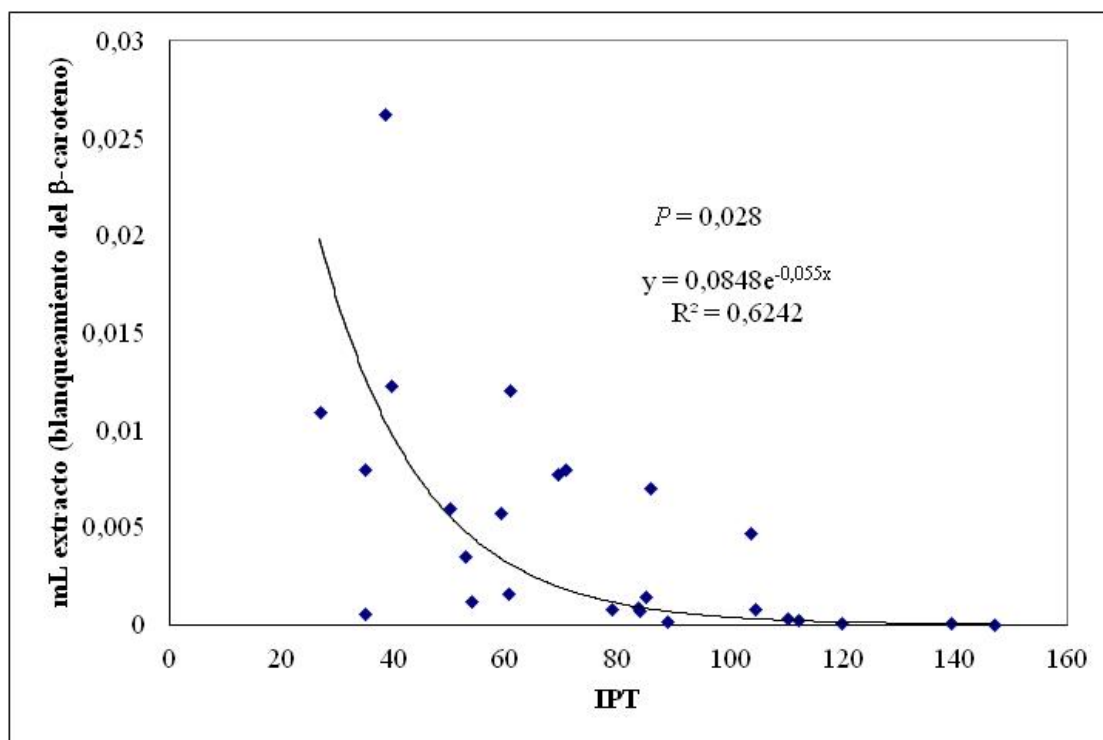


Figura 4.37: Correlación entre el IPT y el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA = 70) de los extractos etanólicos de uva tinta.

Conviene recordar que la medida del IPT proporciona una idea global del contenido en compuestos fenólicos de una muestra y, aunque no permite una cuantificación fidedigna del contenido en los mismos, es muy utilizada en vinos dado su sencillez y rapidez (Canals y col., 2005; Ribéreau-Gayon y col., 2000). En este sentido, algunos autores describen este método, junto con la cata, como dos métodos básicos para determinar el momento óptimo de descube de los vinos tintos (Flanzy, 2003).

Para corroborar la hipótesis planteada respecto a la distinta correlación existente entre los valores de IPT y TEAC en función de la alta o baja actividad de los extractos, se llevó a cabo un estudio de la correlación existente tomando los valores de todos los extractos (tanto acuosos como etanólicos) procedentes de uva tinta (Figura 4.39). De esta manera, se puede observar cómo el comportamiento detectado en los extractos acuosos persiste cuando se tratan todos los datos en su conjunto, y por tanto, confirmando la hipótesis propuesta.

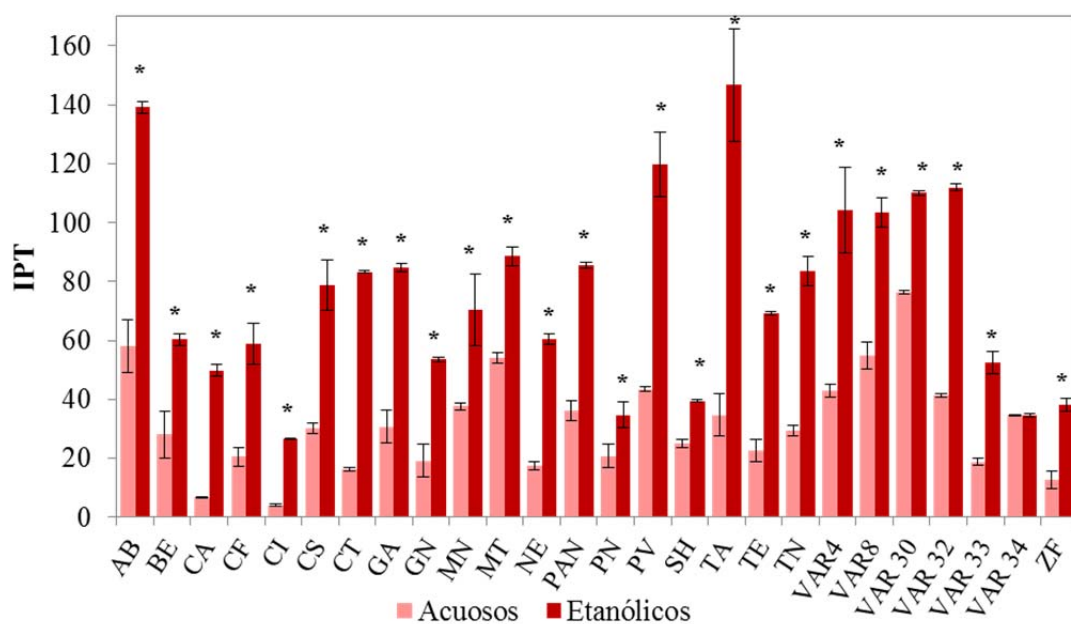


Figura 4.38: Comparación del IPT de los extractos acuosos y etanólicos de uva tinta.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

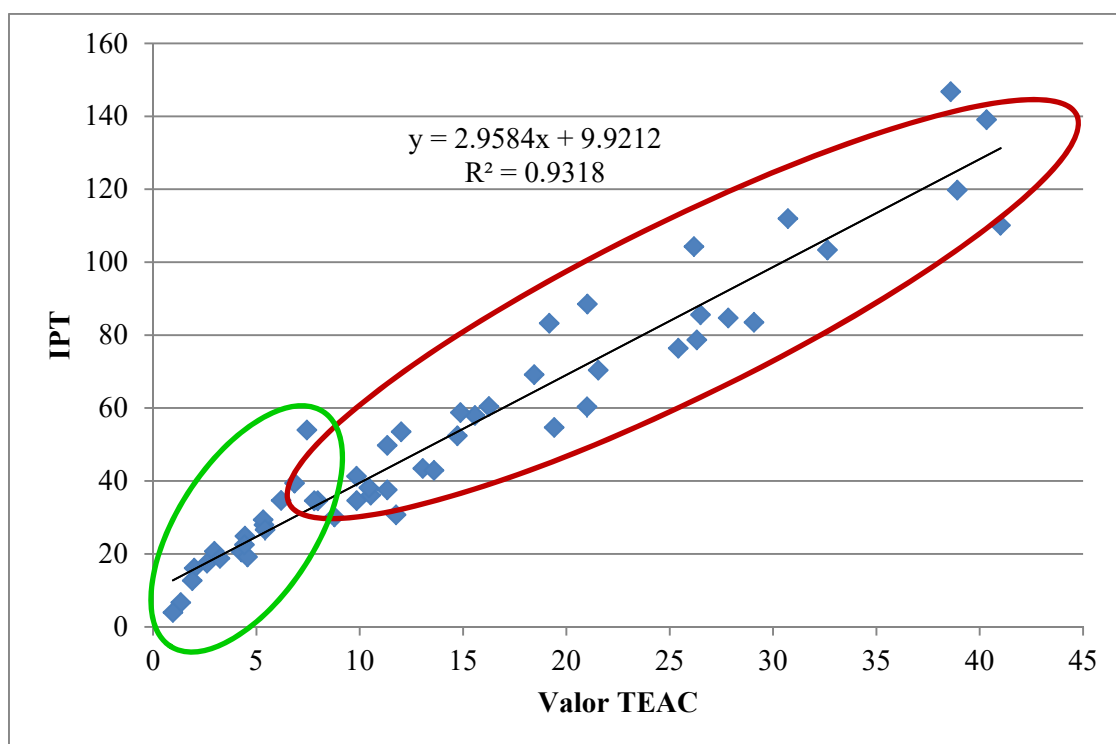


Figura 4.39: Correlación entre el IPT y el valor TEAC (mmol Trolox/L) de todos los extractos de uva tinta.

Análisis HPLC-PAD y UPLC-PAD de los compuestos fenólicos

Como se puede observar en las Tablas 4.5 y 4.6, los compuestos fenólicos monoméricos (Tablas A.12 y A.13 del Anexo) analizados por HPLC-PAD y UPLC-PAD se agruparon en familias, para facilitar la comprensión. Los extractos procedentes de uvas tintas presentaron una familia más de compuestos fenólicos que los obtenidos a partir de uva blanca, los antocianos, que son pigmentos hidrosolubles que dan tonalidad roja y azul a la uva. Este tipo de compuestos se presentan, de manera mayoritaria en el hollejo de la uva, en forma glicosilada, lo que les proporciona una mayor estabilidad y solubilidad en agua (Ribèreau-Gayon, 2006). En el presente trabajo se han analizado los glucósidos 3-O de las siguientes agliconas: cianidina, definidina, malvidina, peonidina y petunidina, puesto que representan la fracción mayoritaria de antocianos glicosilados (Canals y col., 2005; Cantos y col., 2003; Garcia-Beneytez y col., 2003).

Según se deduce de la Tabla 4.5 los antocianos constituyeron, en general, el grupo mayoritario dentro de los compuestos fenólicos de los extractos acuosos procedentes de las uvas tintas, seguido de los flavonoles y flavanoles. Cabe destacar que existe una gran variedad de estudios que refieren la composición fenólica de los hollejos o pepitas de uva, y no la de los granos enteros como se ha realizado en este trabajo, por lo que los resultados son difícilmente comparables (Kammerer y col., 2004, Khanal y col., 2009, Katalinic y col., 2010, Guerrero y col., 2009a).

Los antocianos se hallaron en los extractos de uva tinta en concentraciones muy variables entre 23 mg/L a 134 mg/L (CS y AB, respectivamente) en consonancia con la bibliografía (Llaudy y col., 2005; Valls, 2004, Cantos y col., 2002a; Alén-Ruiz y col., 2009). El grado de madurez es el principal factor que afecta a la acumulación de antocianos en el hollejo de la uva, y estos no son siempre fácilmente extraíbles, incluso cuando el color de la uva es de un rojo intenso (Flanzy, 2003).

Los flavanoles más abundantes volvieron a ser la catequina y epicatequina, como se puede comprobar en la Tabla A.12 del Anexo. El extracto de la VAR 30 fue el que presentó la mayor concentración en flavanoles, aunque con grandes diferencias entre variedades (44,20 mg/L de VAR 30 frente a los 0,03 mg/L de MN) en consonancia con los resultados encontrados en la bibliografía (Cantos y col.,

2002a; Guerrero y col., 2009b), y con un valor promedio notablemente inferior al descrito en vinos tintos (Lorenzo y col., 2005), como debería corresponder al análisis de extractos acuosos. Por otra parte, no se encontraron flavanoles: catequina y epicatequina (Tabla A.12 del Anexo), en los extractos de 8 variedades (BE, CI, CT, GA, MT, VAR32, VAR33 y ZF), posiblemente debido a que éstos se encuentran en forma polimerizada (Sun y col., 2005; Nieto y col., 2015).

Los flavonoles encontrados fueron quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-galactósido y 2,3-dihidroquercetina (Tabla A.12 del Anexo), y mostraron resultados situados entre 2,16 mg/L para la variedad TE y 23 mg/L para el VAR32 coincidiendo con los hallados en vinos (Makris y col., 2006, Cantos y col., 2002a; Xi y col., 2010). Por el contrario, no se han encontrado flavonoles en los extractos acuosos de 10 variedades posiblemente debido a las limitaciones del método analítico empleado, tal como demostraron Castillo-Muñoz y col., 2007).

Los estilbenos cuantificados fueron los *cis*- y *trans*-piceido (Tabla A.12 del Anexo) y se detectaron en 10 variedades, alcanzando los 4 mg/L en extracto acuoso de TN, junto a la variedad TA, cuyo resultado fue de 2,5 mg/L, similares a los descritos por).

Los ácidos hidroxibenzóicos se presentaron en todas las variedades y los resultados se situaron entre 0,31 mg/L para la CI a 19 mg/L para la VAR 30, con valores medios de 2,60 mg/L, unas 3-10 veces inferiores a los hallados en vino tinto (Jensen y col., 2008; Rodríguez-Delgado y col., 2002) como corresponde a extractos que no han sufrido un proceso macerativo. En esta familia se han cuantificado los ácidos gálico, sirínico y vainílico (Tabla A.12 del Anexo), siendo mayoritario el gálico frente al sirínico.

Por último, la familia de los ácidos hidroxicinámicos se situaron en un rango muy amplio, entre 0,032 y 1,85 mg/L (GA y TN, respectivamente), 50 veces inferiores a los descritos en vinos tintos (Cantos y col., 2002a; Xi y col., 2010). Cabe destacar que no se pudieron identificar en los extractos procedentes de 8 variedades. En esta familia se cuantificaron los ácidos ferúlico, *trans*-caféico y *p*-cumárico (Tabla A.12 del Anexo), donde el *trans*-caféico fue el mayoritario con un contenido de 0,42 mg/L de promedio.

Tabla 4.5: Composición fenólica por familias en los extractos acuosos de las variedades de uva tinta (mg/L).

| VAR. | Σ Ácidos hidroxibenzóicos (mg/L) | Σ Ácidos hidroxicinámicos (mg/L) | Σ Estilbenos (mg/L) | Σ Flavanoles (mg/L) | Σ Flavonoles (mg/L) | Σ antocianos (mg/L) |
|--------|---|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AB | 3,77 \pm 0,09* | 1,51 \pm 1,07 | n.d. | 0,13 \pm 0,19 | n.d. | 133,56 \pm 80,22 |
| BE | 6,14 \pm 0,78 | 0,04 \pm 0,05 | n.d. | n.d. | 12,37 \pm 3,15 | 65,84 \pm 4,34 |
| CA | 1,44 \pm 1,12 | 0,05 \pm 0,04 | n.d. | 0,40 \pm 0,57 | 9,21 \pm 4,51 | 59,65 \pm 5,27 |
| CF | 1,31 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,04 | n.d. | 1,00 \pm 1,41 | 2,50 \pm 3,54 | 69,35 \pm 11,62 |
| CI | 0,31 \pm 0,21 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 22,70 \pm 4,14 |
| CS | 1,67 \pm 0,75 | n.d. | n.d. | 0,33 \pm 0,46 | n.d. | 47,40 \pm 1,36 |
| CT | 1,14 \pm 0,08 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 31,90 \pm 3,77 |
| GA | 0,48 \pm 0,22 | 0,03 \pm 0,01 | n.d. | n.d. | n.d. | trazas |
| GN | 1,49 \pm 0,52 | 0,24 \pm 0,11 | n.d. | 1,09 \pm 1,54 | n.d. | 36,38 \pm 11,40 |
| MN | 0,74 \pm 0,23 | 0,05 \pm 0,06 | n.d. | 0,03 \pm 0,05 | 8,96 \pm 0,69 | 85,97 \pm 8,58 |
| MT | 0,24 \pm 0,04 | 0,45 \pm 0,19 | n.d. | n.d. | n.d. | 54,45 \pm 6,93 |
| NE | 1,16 \pm 0,25 | n.d. | n.d. | 0,18 \pm 0,02 | n.d. | 31,33 \pm 1,20 |
| PAN | 1,14 \pm 0,08 | n.d. | 0,55 \pm 0,78 | 0,12 \pm 0,07 | 5,48 \pm 2,82 | 45,10 \pm 1,50 |
| PN | 1,00 \pm 0,17 | 0,12 \pm 0,01 | n.d. | 1,95 \pm 2,76 | n.d. | 43,81 \pm 3,02 |
| PV | 6,15 \pm 0,84 | 0,57 \pm 0,10 | 0,43 \pm 0,61 | 0,62 \pm 0,09 | 12,05 \pm 11,26 | 79,62 \pm 8,10 |
| SH | 0,78 \pm 0,07 | 0,19 \pm 0,02 | 0,06 \pm 0,03 | 3,29 \pm 0,49 | 5,76 \pm 3,15 | 68,67 \pm 3,56 |
| TA | 1,37 \pm 0,55 | 1,38 \pm 0,22 | 2,52 \pm 0,91 | 0,78 \pm 0,16 | 6,02 \pm 0,35 | 81,33 \pm 10,00 |
| TE | 0,47 \pm 0,04 | 0,23 \pm 0,00 | 0,40 \pm 0,04 | 0,25 \pm 0,35 | 2,16 \pm 3,05 | 66,10 \pm 2,22 |
| TN | 3,06 \pm 3,35 | 1,85 \pm 2,58 | 4,45 \pm 3,85 | 4,21 \pm 5,96 | 6,44 \pm 9,11 | 79,03 \pm 42,76 |
| VAR 4 | 2,31 \pm 1,00 | 0,52 \pm 0,40 | 0,02 \pm 0,00 | 5,37 \pm 0,07 | n.d. | 39,58 \pm 8,15 |
| VAR 8 | 1,67 \pm 0,22 | 0,43 \pm 0,43 | 0,04 \pm 0,06 | 2,34 \pm 0,34 | 3,78 \pm 0,51 | 65,74 \pm 7,24 |
| VAR 30 | 18,99 \pm 8,22 | n.d. | 0,61 \pm 0,86 | 44,20 \pm 32,25 | 9,14 \pm 1,01 | 81,18 \pm 10,30 |
| VAR 32 | 4,87 \pm 1,41 | 0,36 \pm 0,51 | n.d. | n.d. | 22,60 \pm 6,85 | 79,74 \pm 46,41 |
| VAR 33 | 1,66 \pm 0,68 | n.d. | 1,20 \pm 1,69 | n.d. | 13,46 \pm 6,82 | 57,97 \pm 15,62 |
| VAR 34 | 2,25 \pm 1,01 | n.d. | n.d. | 0,10 \pm 0,14 | 7,10 \pm 4,74 | 60,28 \pm 4,00 |
| ZF | 1,57 \pm 0,07 | 0,05 \pm 0,07 | n.d. | n.d. | n.d. | 56,49 \pm 8,76 |

*Media \pm SD; n.d.= no detectado

Por otro lado, al igual que en sus correspondientes extractos acuosos, los antocianos constituyeron el principal grupo de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos, seguido de los flavonoles y flavanoles (Tabla 4.6).

Por su parte, la presencia de etanol favoreció el incremento de todas las familias de compuestos fenólicos, así como de los compuestos individuales (Tabla A.13 del Anexo) entre 3 y 10 veces, respecto a los acuosos.

En vinos las concentraciones de antocianos son muy variables y se sitúan en un intervalo entre 1 y 400 mg/L (Álvarez y col., 2006; Canals y col., 2005; Pérez-Jiménez y col., 2010), coincidiendo con la gran variabilidad de contenidos reflejados en esta memoria; donde el máximo contenido los presentó AB (336 mg/L) y el mínimo CI (41 mg/L). Los resultados obtenidos para las variedades MN, CS, SH y MT fueron ligeramente menores a los descritos por Romero-Cascales (Romero-Cascales y col., 2005), lo que podría ser debido al diferente origen de la muestra y contenido en alcohol; de esta manera, en el presente estudio se trató de extractos con contenido en etanol del 12%, mientras que en el ensayo de Romero-Cascales y col., 2005) se trabajaba con vinos tintos de mayor graduación (14,7 – 15,7 % de grado alcohólico probable).

El contenido en flavanoles se situó entre 0,90 mg/L para GA, mayoritariamente epicatequina, y 164 mg/L para VAR30, que correspondió a catequina, siendo estos los dos únicos compuestos de esta familia analizada. No se detectó en CT posiblemente por estar polimerizados. Según diversos estudios (de Beer y col., 2002; Manach y col., 2004; Anastasiadi y col., 2010; Pérez-Jiménez y col., 2010), las concentraciones relativas de flavanoles en vino tinto se sitúan entre 27 y 300 mg/L, en consonancia con los valores encontrados en el presente estudio. Sin embargo, otros autores han descrito valores superiores para algunas variedades (Landrault y col., 2001; Šeruga y col., 2011), posiblemente debido a que la fermentación alcohólica rompe enlaces glicosídicos o con el ácido gálico, lo que daría lugar a un aumento de su concentración (Betés-Saura y col., 1996; Makris y col., 2006).

Tabla 4.6: Composición fenólica por familias en los extractos etanólicos de las variedades de uva tinta.

| VAR. | Σ Ácidos hidroxibenzóicos (mg/L) | Σ Ácidos hidroxicinámicos (mg/L) | Σ Estilbenos (mg/L) | Σ Flavanoles (mg/L) | Σ Flavonoles (mg/L) | Σ Antocianos (mg/L) |
|--------|---|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AB | 6,35 \pm 0,67 | 34,20 \pm 10,20 | 1,60 \pm 0,21 | 63,18 \pm 40,85 | 33,44 \pm 9,48 | 335,57 \pm 26,06 |
| BE | 5,65 \pm 1,30 | n.d. | 0,54 \pm 0,07 | 15,03 \pm 2,18 | 9,16 \pm 0,53 | 59,42 \pm 3,82 |
| CA | 2,51 \pm 0,61 | 0,08 \pm 0,01 | 0,86 \pm 0,09 | 1,83 \pm 0,33 | 17,72 \pm 3,14 | 41,48 \pm 8,45 |
| CF | 2,50 \pm 0,44 | 0,42 \pm 0,05 | n.d. | 18,51 \pm 14,95 | 19,12 \pm 5,99 | 160,76 \pm 26,14 |
| CI | 2,09 \pm 1,11 | n.d. | 0,31 \pm 0,06 | 33,39 \pm 24,61 | 6,88 \pm 0,98 | 40,89 \pm 2,94 |
| CS | 7,90 \pm 1,83 | 4,53 \pm 0,79 | n.d. | 25,70 \pm 14,58 | 6,40 \pm 0,24 | 67,52 \pm 4,00 |
| CT | 5,03 \pm 1,00 | 0,68 \pm 0,02 | n.d. | n.d. | 10,91 \pm 0,71 | 86,51 \pm 27,67 |
| GA | 1,50 \pm 0,16 | 0,15 \pm 0,01 | n.d. | 0,90 \pm 0,17 | 7,30 \pm 3,04 | 80,72 \pm 9,72 |
| GN | 2,81 \pm 0,02 | 0,00 \pm 0,00 | 0,34 \pm 0,02 | 5,22 \pm 1,67 | 23,11 \pm 6,31 | 101,03 \pm 6,42 |
| MN | 3,83 \pm 0,04 | 3,19 \pm 3,32 | 1,03 \pm 0,10 | 10,90 \pm 0,32 | 51,52 \pm 9,97 | 179,16 \pm 30,23 |
| MT | 2,26 \pm 2,49 | 0,78 \pm 0,06 | 0,04 \pm 0,02 | 46,58 \pm 63,36 | 23,49 \pm 4,80 | 164,61 \pm 10,25 |
| NE | 1,82 \pm 0,09 | 0,83 \pm 0,86 | n.d. | 1,69 \pm 2,39 | 24,27 \pm 13,31 | 75,60 \pm 17,28 |
| PAN | 0,25 \pm 0,02 | 1,43 \pm 0,41 | 1,91 \pm 0,13 | 9,56 \pm 1,56 | 11,96 \pm 0,86 | 62,20 \pm 8,03 |
| PN | 2,09 \pm 0,97 | 0,21 \pm 0,06 | 0,03 \pm 0,04 | 7,82 \pm 6,55 | 6,20 \pm 3,84 | 119,18 \pm 30,30 |
| PV | 1,66 \pm 0,50 | 3,12 \pm 0,45 | 2,64 \pm 0,28 | 10,26 \pm 0,28 | 22,86 \pm 1,78 | 95,64 \pm 2,42 |
| SH | 2,92 \pm 0,09 | 1,24 \pm 0,03 | 0,21 \pm 0,04 | 23,35 \pm 0,52 | 18,30 \pm 4,41 | 155,77 \pm 12,31 |
| TA | 2,22 \pm 0,37 | 0,12 \pm 0,02 | 4,46 \pm 0,60 | 29,14 \pm 8,88 | 4,58 \pm 0,35 | 127,69 \pm 22,83 |
| TE | 1,93 \pm 0,80 | 0,77 \pm 0,17 | 0,07 \pm 0,02 | 2,30 \pm 2,21 | 11,37 \pm 0,83 | 122,26 \pm 19,10 |
| TN | 2,28 \pm 0,47 | 0,23 \pm 0,03 | 10,27 \pm 0,87 | 18,38 \pm 13,33 | 10,63 \pm 1,38 | 152,87 \pm 30,39 |
| VAR 4 | 6,57 \pm 0,80 | 0,84 \pm 0,26 | 0,44 \pm 0,62 | 74,64 \pm 25,36 | 21,84 \pm 14,03 | 152,56 \pm 14,62 |
| VAR 8 | 2,93 \pm 0,17 | 0,47 \pm 0,00 | 0,60 \pm 0,26 | 4,83 \pm 0,40 | 14,02 \pm 7,46 | 94,97 \pm 18,94 |
| VAR 30 | 43,17 \pm 9,74 | 0,02 \pm 0,03 | 0,83 \pm 0,80 | 164,04 \pm 46,90 | 8,53 \pm 0,06 | 138,55 \pm 0,40 |
| VAR 32 | 5,93 \pm 0,96 | n.d. | 1,29 \pm 1,82 | 10,43 \pm 2,13 | 42,64 \pm 20,04 | 177,36 \pm 14,19 |
| VAR 33 | 0,27 \pm 0,15 | 0,68 \pm 0,04 | n.d. | 3,42 \pm 0,41 | 34,22 \pm 3,88 | 84,25 \pm 4,56 |
| VAR 34 | 0,99 \pm 1,18 | 0,06 \pm 0,02 | 1,28 \pm 1,28 | 2,69 \pm 3,80 | 26,99 \pm 10,70 | 104,26 \pm 1,30 |
| ZF | 3,73 \pm 0,15 | n.d. | 0,24 \pm 0,28 | 40,98 \pm 6,77 | 3,84 \pm 0,23 | 152,78 \pm 9,59 |

*Media \pm SD; n.d.= no detectado.

Los valores encontrados de flavonoles oscilaron entre 4 mg/L (ZF) y 52 mg/L (MN), encontrándose en todas las variedades, como mínimo uno de los tres compuestos detectados quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido o 2,3-dihidroquercetina. Del conjunto de los flavonoles, el compuesto más habitual es la quercetina 3-O-galactósido (Tabla A.13 del Anexo), junto con la quercetina 3-O-glucósido. Los valores obtenidos son similares a los obtenidos por otros autores (de Beer y col., 2002; García-Ruiz y col., 2007, Cantos y col., 2002a, Makris y col., 2006), en los que se registraron un amplio intervalo de valores, desde niveles trazas hasta 28,5 mg/L en vinos tintos (Anastasiadi y col., 2010; Šeruga y col., 2011). Conviene mencionar la influencia de la irradiación solar sobre el contenido en flavonoles y estilbenos, de tal manera que su contenido puede verse aumentado 10 veces en uvas expuestas al sol respecto a aquellas que crecen a la sombra (Makris y col., 2006).

De nuevo, los ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico, sirínico y vainílico) estaban presentes en todos los extractos etanólicos y con valores superiores a los obtenidos en los extractos acuosos de 0,25 a 43 mg/L para PAN y VAR30 respectivamente, con un promedio de 4,7 mg/L. En vinos tintos se han encontrado valores similares, encontrándose igualmente un intervalo de valores muy amplio (0-260 mg/L) (Beer y col., 2002). Es de esperar que los factores que condicionan la composición del extracto sean muy diversos, desde la zona donde se cultivan las vides, al método de extracción utilizado en el proceso de vinificación o las características varietales. En este sentido, se han encontrado valores muy variables de ácido gálico en vinos tintos en función del estudio analizado (Landrault y col., 2001; Pérez-Jiménez y col., 2010; Šeruga y col., 2011).

La cuantificación de ácidos hidroxicinámicos no fue posible en los extractos procedentes de variedades como BE, CI, VAR32 y ZF, mientras que en otros su contenido fue muy bajo (0,01 mg/L y 0,02 mg/L, para GN y VAR30 respectivamente). En contraposición, otras variedades demostraron poseer un alto contenido (34 mg/L para AB). Por otro lado, los contenidos descritos en la bibliografía para el ácido caféico y p-cumárico (principales ácidos hidroxicinámicos cuantificados en los extractos) es muy variable en función del estudio consultado y de las variedades analizadas (Landrault y col., 2001; Lorenzo y col., 2005; Šeruga y col., 2011). En este sentido, los resultados obtenidos para variedades como GN, CA,

TE o MT fueron similares a los descritos por Landrault y col., 2001) en vinos tintos, tal como puede verificarse en la Tabla A.13 del Anexo.

El mayor contenido en estilbenos lo mostró el extracto etanólico de TN (10 mg/L) y el mínimo (0,03 mg/L) el de PN. Asimismo, no se detectó esta familia de compuestos en los extractos de CF, CS, CT, GA, NE y VAR 33. Los valores son similares (Kostadinoviæ y col., 2012, Fernández-Mar y col., 2012, Anastasiadi y col., 2010) o algo inferiores (Pérez-Jiménez y col., 2010) a los encontrados en vinos tintos. Los compuestos monoméricos medidos de esta familia fueron piceídos (cis y trans-resveratrol glucosidado), junto con cis-resveratrol con valores que llegan a la unidad, probablemente como respuesta de defensa a un comienzo de infección microbiana (Fernández-Mar y col., 2012).

Por último, con el fin de proceder a una comparación global del contenido en compuestos fenólicos entre los dos tipos de extractos, las familias de compuestos fenólicos se sumaron en cada extracto. Como se puede observar en la Figura 4.40 los extractos etanólicos mostraron, en general, un mayor contenido en compuestos fenólicos que los acuosos, tanto como suma total como suma de cada una de las distintas familias de compuestos, aunque los extractos de algunas variedades no mostraron diferencias significativas entre ellos para ciertas familias.

El contenido global en compuestos fenólicos de los extractos etanólicos osciló entre 64 y 474 mg/L para CA y AB respectivamente, y en los extractos acuosos entre 0,51 y 154 mg/L para GA y VAR30. Aunque los compuestos fenólicos analizados difieren ligeramente entre los distintos estudios analizados, la suma total de compuestos coincide con la observada en otros estudios (Landrault y col., 2001; Cantos y col., 2002a). Tal y como describen otros autores la menor polaridad de las soluciones hidroalcohólicas favorece la extracción de compuestos fenólicos (Lapornik y col., 2005).

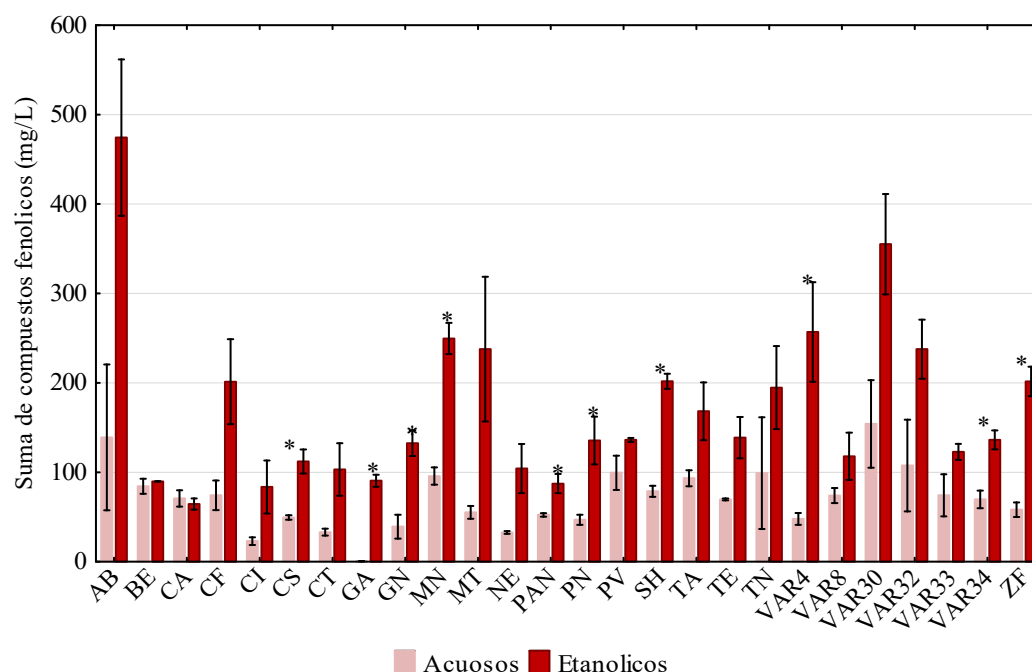


Figura 4.40: Comparación de la suma de compuestos fenólicos de los extractos acuosos y etanólicos de uva tinta.

*Se reflejan con asterisco las diferencias significativas del test de la t de Student ($p \leq 0,05$).

Una vez analizada la actividad antioxidante y el perfil de compuestos fenólicos se procedió al estudio de correlación entre las distintas familias de compuestos fenólicos y los valores TEAC encontrados, tanto en extractos acuosos como en etanólicos; aunque vistos los resultados expuestos con anterioridad ya se intuía cierta correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante. En este sentido, para los extractos acuosos las variedades AB, VAR30, y VAR33 fueron las más ricas en compuestos fenólicos con valores alrededor de 162 mg/L, así como una alta actividad antioxidante. De esta manera, se llevó a cabo el estudio de sus correlaciones de manera independiente en función del tipo de extracto.

En la Figura 4.41 se muestra la recta de regresión entre la suma de compuestos fenólicos y el valor TEAC de los extractos acuosos.

Se comprobó que había una correlación significativa ($p \leq 0,05$) entre la suma de compuestos fenólicos de los extractos acuosos y el valor TEAC (Figura 4.41), aunque con una varianza (R^2) del 0,28, coincidiendo con los resultados obtenidos por Alén-Ruiz y col., 2009). A semejanza de las variedades blancas, se buscó qué familias contribuían significativamente a dicha correlación mediante un estudio de regresión múltiple (Tabla 4.7).

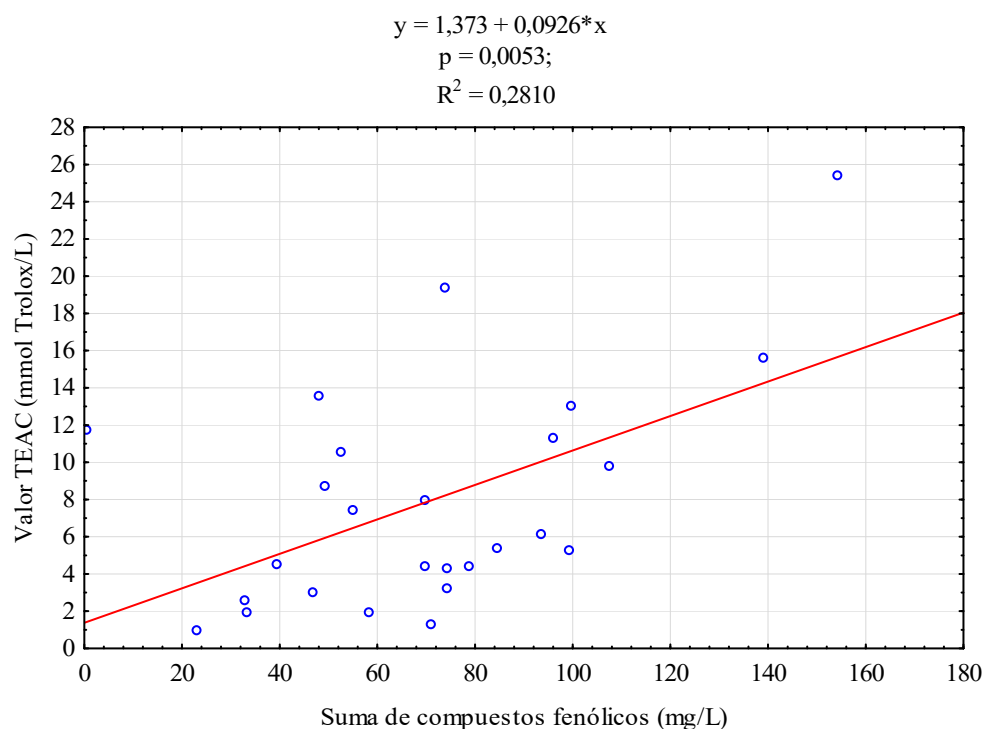


Figura 4.41: Correlación entre el valor TEAC y la suma de compuestos fenólicos en los extractos acuosos de uva tinta.

Un análisis de componentes principales entre el valor TEAC y las familias de compuestos fenólicos de los extractos acuosos, permite observar si hay alguna familia con mayor influencia sobre la actividad antioxidante. La Tabla 4.7 demuestra que con 3 ejes se acumula más del 70% de la varianza, por lo tanto un gráfico tridimensional o 3 bidimensionales son suficientes para ver dicha influencia. Como en los casos anteriores, el valor TEAC está más relacionado con el factor 1, y en menor medida con los factores 2 y 3. En este caso, todas las familias de compuestos fenólicos están relacionadas con el factor 1 y en menor medida con los otros dos factores.

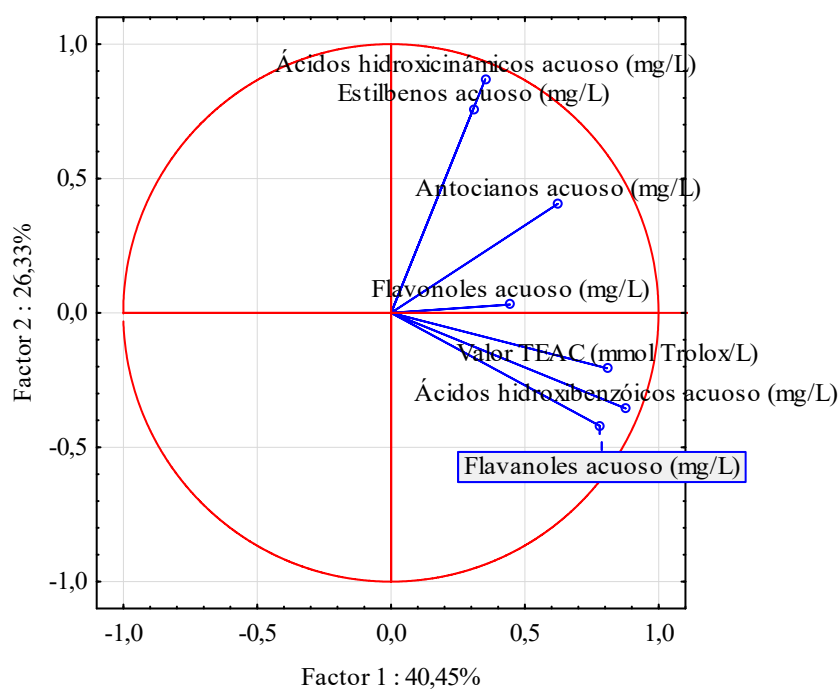
Por otro lado, el valor TEAC se encuentra relacionado con todas las familias de compuestos fenólicos, especialmente con los ácidos hidroxibenzóicos, flavanoles y en menor medida con los flavonoles, mientras que su correlación con los ácidos hidroxicinámicos y antocianos es más difusa (Figuras 4.42 y 4.43).

Los ácidos hidroxicinámicos y estilbenos también correlacionan con el valor TEAC en el factor 3 (figura 4.43) aunque no los ácidos hidroxibenzóicos entre otras familias.

Tabla 4.7. Análisis de componentes principales de los extractos acuosos de variedades uvas tintas.

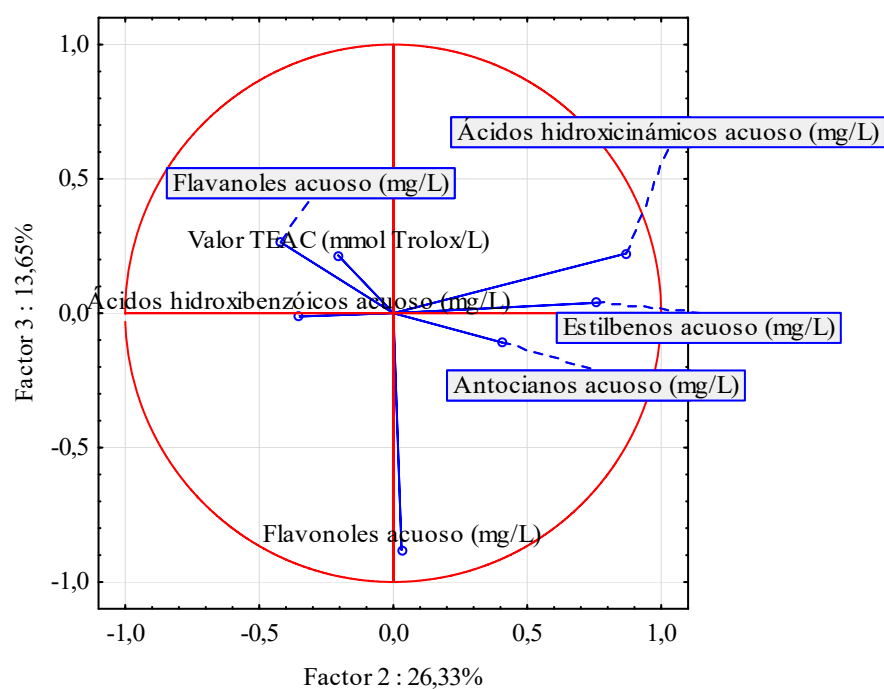
| Factores | Valor propio | Varianza total (%) | Valor propio acumulado | Varianza acumulada (%) |
|----------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 2,8 | 40,5 | 2,8 | 40,5 |
| 2 | 1,8 | 26,3 | 4,7 | 66,8 |
| 3 | 1,0 | 13,6 | 5,6 | 80,4 |
| 4 | 0,9 | 12,9 | 6,5 | 93,4 |
| 5 | 0,3 | 3,8 | 6,8 | 97,1 |
| 6 | 0,2 | 2,2 | 7,0 | 99,4 |
| 7 | 0,04 | 0,6 | 7,0 | 100 |

En resumen, el valor TEAC se explica básicamente por los flavanoles que correlacionan en los 3 factores y las familias que menos influyen son los antocianos y flavonoles que sólo correlacionan con el factor 1 (figuras 4.42 y 4.43).



◦ Familia compuestos fenólicos

Figura 4.42. Proyección de las familias de compuestos acuosos de uva tinta, en el plano de los factores 1 y 2 en el análisis de componentes principales.



○ Familia compuestos fenólicos

Figura 4.43. Proyección de las familias de compuestos acuosos de uva tinta, en el plano de los factores 2 y 3 en el análisis de componentes principales.

En cuanto a los extractos etanólicos, la recta de correlación entre la suma de compuestos fenólicos y el valor TEAC también resultó significativa $p \leq 0,05$, pero como en los extractos acuosos, la varianza fue baja (0,22) (Figura 4.44).

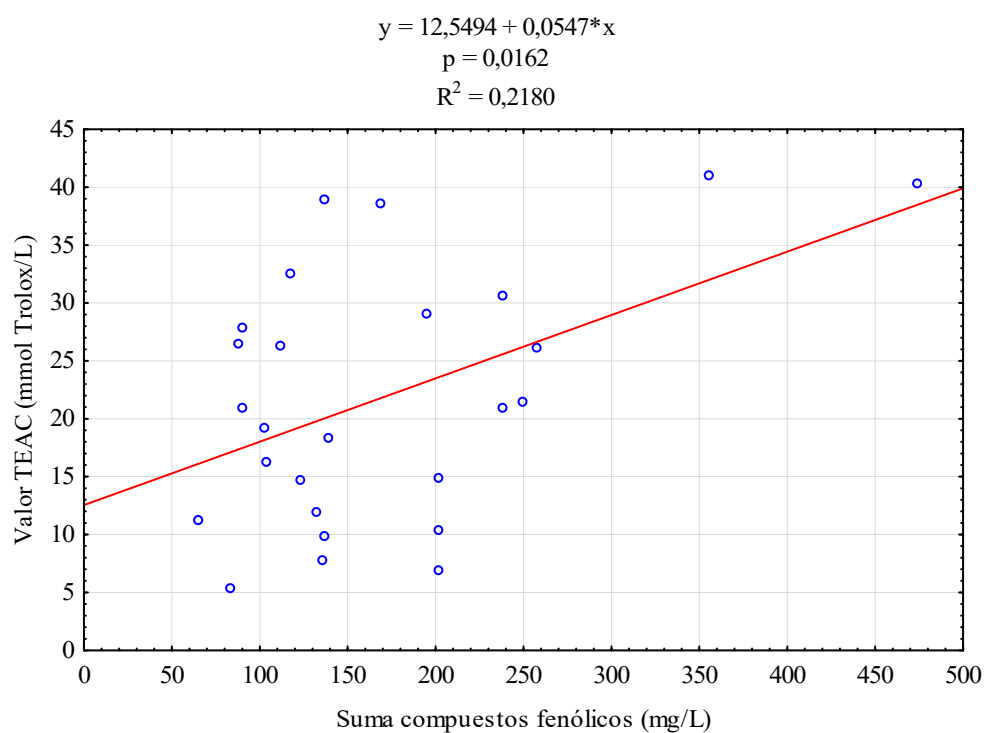


Figura 4.44: Correlación entre suma de compuestos fenólicos y valor TEAC en los extractos etanólicos de uva tinta, significativa si $p \leq 0,05$.

En este tipo de extractos, como ya ocurría en los casos anteriores, también son suficientes 3 factores para explicar la varianza, tal como se puede comprobar en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Análisis de componentes principales de los extractos acuosos de variedades uvas tintas.

| Factores | Valor propio | Varianza total (%) | Valor acumulado propio | Varianza acumulada (%) |
|----------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 2,6 | 37,7 | 2,6 | 37,7 |
| 2 | 1,8 | 25,0 | 4,4 | 62,7 |
| 3 | 1,2 | 17,1 | 5,6 | 79,9 |
| 4 | 0,7 | 9,3 | 6,2 | 89,2 |
| 5 | 0,5 | 6,9 | 6,7 | 96,1 |
| 6 | 0,2 | 2,7 | 6,9 | 98,8 |
| 7 | 0,1 | 1,2 | 7,0 | 100 |

En los extractos etanólicos también se observó que los flavanoles y ácidos hidroxibenzóicos explicaban el valor TEAC en un 62,7%, debido a la correlación con los ejes o factores 1 y 2 (figura 4.45).

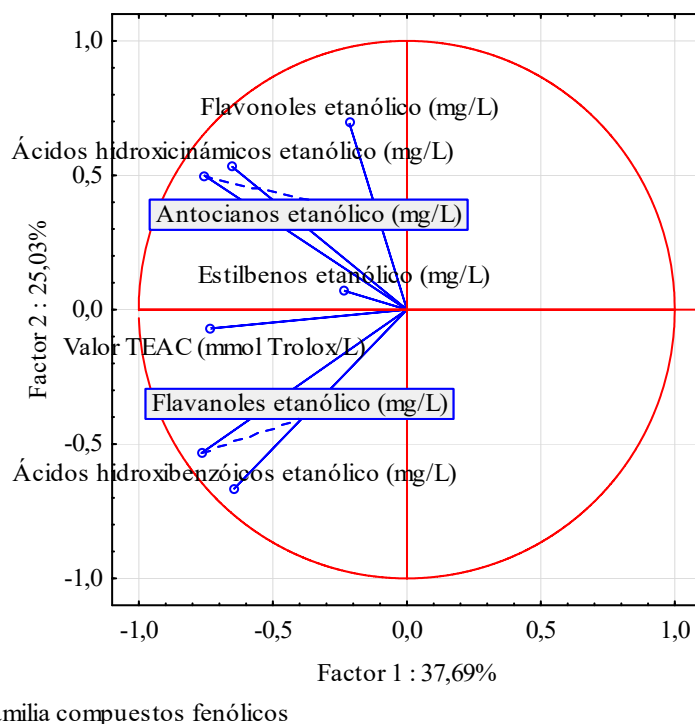


Figura 4.45. Proyección de las familias de compuestos etanólicos de uva tinta, en el plano de los factores 1 y 2 en el análisis de componentes principales.

En cambio en el factor 3, el único que explica la varianza son los estilbenos (figura 4.46).

Respecto a la relación existente entre el valor TEAC y las distintas familias de compuestos fenólicos, el análisis de componentes principales indica que el valor TEAC es debido principalmente a los flavanoles, ácidos hidroxibenzóicos y a los estilbenos. Y respecto a la uva tinta, la familia que aporta mayor actividad antioxidante o valor TEAC es los flavanoles, seguida por los ácidos hidroxibenzóicos y estilbenos.

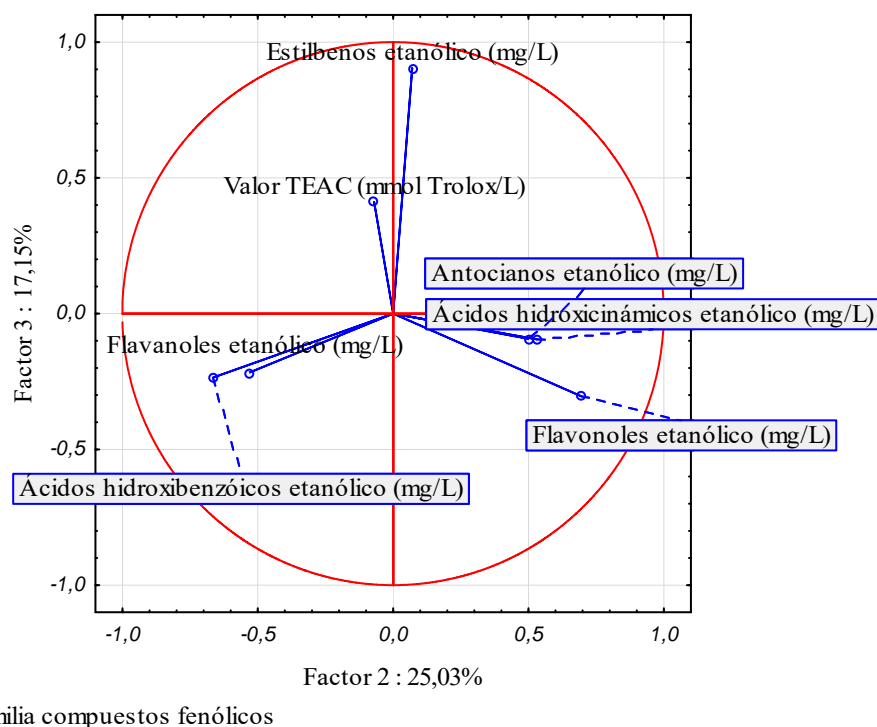


Figura 4.46. Proyección de las familias de compuestos etanólicos de uva tinta, en el plano de los factores 2 y 3 en el análisis de componentes principales.

Una vez analizados todos los datos correspondientes a las uvas tintas, se puede concluir que las variedades con un mayor potencial de cara a la obtención de vinos tintos con alto contenido en compuestos fenólicos antioxidante resultaron ser AB, PV, VAR30, VAR32 y VAR8, junto con la variedad MT. Asimismo, los flavanoles, junto con los ácidos hidroxibenzóicos son los principales responsables de la actividad antioxidante de los extractos, mientras que el papel desempeñado por el resto de familias es ambivalente en función del tipo de extracto analizado.

Asimismo, queda demostrada la implicación de otros compuestos, distintos de los fenólicos, en la actividad antioxidante de los extractos analizados, aunque sería necesario un estudio más profundo, con un mayor número de variedades, junto con un análisis más exhaustivo de la composición fenólica de los extractos, para afirmar el papel ejercido por cada familia de compuestos fenólicos en dicha actividad.

Por otro lado, conviene destacar el alto potencial de las variedades de uva blanca ya comentadas en el apartado anterior (RO, GW, RI, VG y AL) como fuente de compuestos fenólicos antioxidantes, con valores superiores a los encontrados en

los extractos de ciertas variedades de uva tinta; y de algunas de las variedades de uva tinta utilizadas en este memoria (AB, PV, VAR30, VAR32, VAR8 y MT, entre otras), en especial mediante el uso de maceración con hollejos durante el proceso fermentativo. En este sentido, este estudio pone de manifiesto la importancia que representa la recuperación de variedades ancestrales como fuente de compuestos fenólicos antioxidante, con lo que poder formular vinos, o bebidas saludables a base de vino, con un alto potencial antioxidante.

4.2. Evaluación de la actividad funcional *in vivo* de extractos procedentes de uva

4.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos

Durante el proceso de vinificación uno de los principales subproductos que se genera son los hollejos, de los que, tal y como se ha demostrado en el apartado anterior, se puede obtener un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes que permita el desarrollo de una bebida funcional.

De esta manera, y con el objetivo de conocer las condiciones más favorables para la obtención de una bebida dotada de una alta actividad antioxidante, se analizó la influencia de la variedad de uva, la temperatura y la mezcla de agua: etanol (datos no mostrados) sobre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, designadas como 1, 2 o 3.

El proceso consistió en una extracción sólido-líquido de hollejos de variedades con distinta actividad antioxidante, tanto de uva blanca (Garnacha blanca, Parellada y Riesling) como tinta (Merlot y Cinsault), a partir de las cuales se habían obtenido resultados interesantes en el estudio mostrado en el apartado anterior (Apartado 4.1), así como en estudios anteriores del grupo de trabajo (Nieto, 2015) y de las que se podía disponer de un volumen suficiente para hacer comercialmente viable su producción. Así, tal y como se ha indicado en el apartado 3.1.1 de Materiales y Métodos y partiendo de cada una de estas variedades se obtuvieron tres extractos distintos (designados como 1, 2 o 3), en función de la temperatura y medio hidroalcohólico utilizado.

En la Tabla 4.9, se reflejan los resultados obtenidos respecto a la actividad antioxidante, medida con el método del radical ABTS^{•+}, de las distintas pruebas realizadas.

Una vez evaluada la actividad antioxidante de los distintos extractos procedentes de hollejos, así como su correspondiente rendimiento de extracción, se decidió la utilización del extracto GB 2 para llevar a cabo el estudio con animales. Se estandarizó la actividad antioxidante de dicho extracto a 7 y 14 mmol trolox/L (este último evaporando parte del extracto original).

Asimismo, una vez analizados los resultados obtenidos en el estudio preclínico, se decidió utilizar un extracto con una mayor actividad antioxidante *in vitro*, procedente de uva tinta, para llevar a cabo el estudio clínico (MT3).

Tabla 4.9. Valor TEAC (mmol Trolox/L) (método del radical ABTS^{•+}) de los extractos obtenidos a partir de hollejos.

| DENOMINACIÓN | mmol trolox/L |
|--------------|---------------|
| GB1 | 8,66 ± 0,02 |
| GB2 | 8,87 ± 0,08 |
| GB3 | 53,2 ± 1,46 |
| PA1 | 6,05 ± 0,12 |
| PA2 | 9,27 ± 0,08 |
| PA3 | 39,7 ± 1,27 |
| RI1 | 1,98 ± 0,07 |
| RI2 | 2,89 ± 0,12 |
| RI3 | 23,76 ± 1,80 |
| MT1 | 23,5 ± 1,23 |
| MT2 | 27,4 ± 1,99 |
| MT3 | 77,5 ± 7,92 |
| CI1 | 8,04 ± 0,17 |
| CI2 | 12,84 ± 0,27 |
| CI3 | 31,70 ± 0,65 |

4.2.2. Estudios celulares

Como paso previo a los estudios *in vivo* (estudio con animales y estudio clínico) se llevó a cabo un estudio celular sobre las propiedades cardiosaludables de los extractos procedentes de uva utilizados en dichos estudios (GB2 y MT3).

4.2.2.1. Estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los extractos

En primer lugar se llevó a cabo el estudio de la biodisponibilidad de los dos extractos sólido-líquido que mejores resultados ofrecieron respecto a su actividad antioxidante, tanto en uvas blancas (GB2) como en tintas (MT3).

El estudio de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos constituye una herramienta importante de cara a la posible funcionalidad *in vivo* de los compuestos fenólicos. De esta manera, el proceso de digestión de estos compuestos puede dar lugar a una disminución en los mismos, afectando a su actividad antioxidante (Fernandez y col., 2013; Liang y col., 2012; Martínez-Ortega y col., 2001). Del mismo modo, el proceso de absorción intestinal, tras la etapa de la digestión, resulta particular según la matriz y composición fenólica general (Serra y col., 2010), lo que hace necesario evaluar la absorción potencial de los compuestos fenólicos.

De esta manera, los extractos seleccionados se sometieron a un proceso de digestión *in vitro*, tras el cual, se estudió la absorción intestinal de los extractos de hollejos elegidos, utilizando el modelo celular Caco-2 y su influencia en la actividad antioxidante de la fracción biodisponible. El método utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante fue el del radical DPPH[•], puesto que no presenta interferencias con los distintos componentes de las secreciones digestivas, y por tanto, constituye un método adecuado para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos a partir de extractos y alimentos a lo largo del proceso de digestión (Huang y col., 2014).

Proceso de digestión

De los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante durante el proceso digestivo (Figura 4.47) se infiere que la etapa de digestión estomacal es la que produjo un descenso más acusado de la misma. De esta manera, el proceso de masticación inicial parece no tener ningún efecto sobre dicha actividad, mientras que la digestión intestinal produce una disminución menos acusada de la capacidad antioxidante que la estomacal. Cabe mencionar que la centrifugación del líquido obtenido durante el proceso digestivo también provocó una ligera disminución de la actividad antioxidante de los extractos, achacable a la precipitación de compuestos.

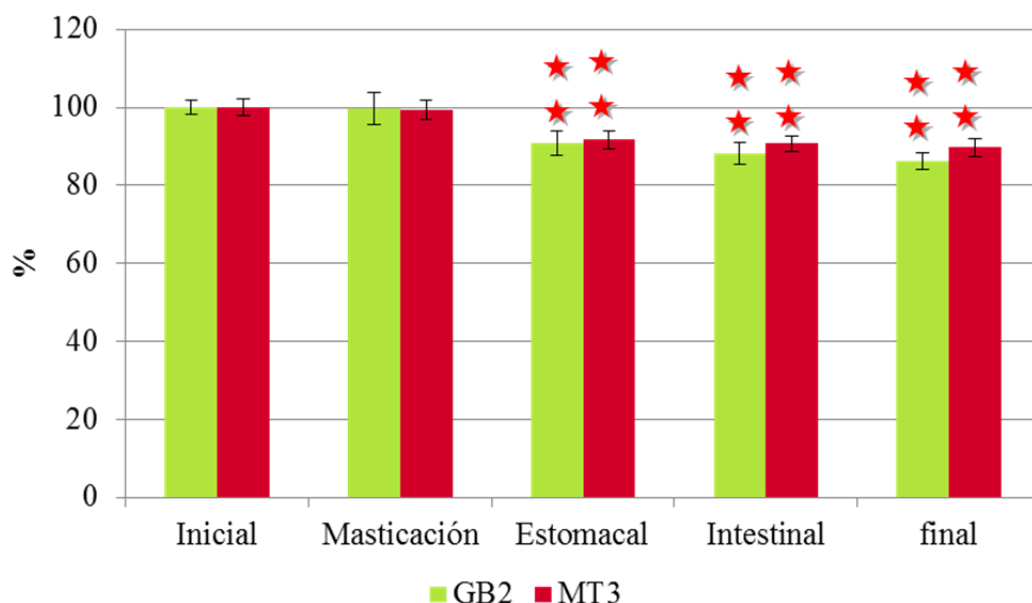


Figura 4.47. Evolución del valor TEAC de los extractos sólido/líquido seleccionados durante el proceso de digestión *in vitro*. ★ $p \leq 0,05$

Por otro lado, se registró un comportamiento similar en los dos tipos de extractos, independientemente de su diferente origen, de tal manera que en el caso del extracto GB2 el proceso de digestión provocó una pérdida del 14% de la actividad antioxidante inicial del extracto, mientras que esta pérdida se cuantificó en un 10% en el caso del extracto MT3. En este sentido, en otros estudios llevados a cabo en el grupo de investigación sí se observó una clara influencia de la variedad de uva en la bioaccesibilidad de extractos fenólicos obtenidos a partir de uvas tanto blancas como tintas, observándose pérdidas desde el 15 al 42% del valor TEAC de los extractos. Estas diferencias se achacaron a la distinta composición fenólica de los extractos (Nieto, 2015). De esta manera se puede concluir que los extractos utilizados en los estudios con animales y clínicos presentaban una alta bioaccesibilidad.

Diversos autores han estudiado el efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, obteniéndose resultados muy dispares. Así, en algunos estudios se observó que el proceso de digestión provocó un incremento en la actividad antioxidante, asociado a un aumento en el contenido de compuestos fenólicos (Noguer y col., 2008; Wootton-Beard y col., 2011). Mientras que otros autores indicaron pérdidas de actividad antioxidante asociadas a cambios en la

composición fenólica, en particular a un descenso de flavonoides durante el proceso digestivo (Chen y col., 2013; Huang y col., 2014). De esta manera, las variaciones provocadas por el proceso de digestión estarían relacionadas con la composición fenólica de los extractos utilizados en los ensayos (Tagliazucchi y col., 2010) .

Estudio de toxicidad

Una vez realizado el proceso de digestión se procedió al estudio de toxicidad en la línea celular Caco-2 mediante el protocolo MTT. Este estudio constituye un paso previo imprescindible de cara a la evaluación de la biodisponibilidad de los extractos. Para ello, se añadieron distintas concentraciones del producto final de las digestiones, evaluándose a continuación el porcentaje de células vivas en cada caso, tomando como 100% de viabilidad un control constituido exclusivamente por medio de cultivo. A partir de los resultados obtenidos se decidió el empleo de una dilución de 80 $\mu\text{L/mL}$ para llevar a cabo el estudio de biodisponibilidad (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Viabilidad celular de los extractos digeridos (%)

| | 150 $\mu\text{L/mL}$ | 100 $\mu\text{L/mL}$ | 75 $\mu\text{L/mL}$ | 50 $\mu\text{L/mL}$ | 25 $\mu\text{L/mL}$ | 15 $\mu\text{L/mL}$ |
|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Dig. control | 85 \pm 5 | 92 \pm 4 | 95 \pm 6 | 105 \pm 8 | 101 \pm 4 | 104 \pm 6 |
| Dig. GB2 | 19 \pm 3 | 67 \pm 5 | 89 \pm 7 | 98 \pm 4 | 97 \pm 5 | 102 \pm 7 |
| Dig. MT3 | 15 \pm 4 | 68 \pm 3 | 102 \pm 5 | 103 \pm 6 | 102 \pm 4 | 101 \pm 5 |

Biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes

Para la simulación de la absorción intestinal de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos se utilizó la línea celular Caco-2, procedente de enterocitos de carcinoma humano. Los ensayos se realizaron con enterocitos maduros con un TEER cercano a 400 Ω/cm^2 .

Como se puede observar en la Figura 4.48 la actividad antioxidante de la fracción biodisponible de los extractos sólido-líquido, que constituyen la base de la bebida funcional en desarrollo, se situó en un 34 y 36% para los extractos GB2 y

MT3, respectivamente; es decir, alrededor del 60% de la actividad antioxidante del producto se pierde durante la absorción de estos extractos a través de la capa de enterocitos. Estos resultados coinciden con otros obtenidos en el grupo de investigación (Nieto, 2015).

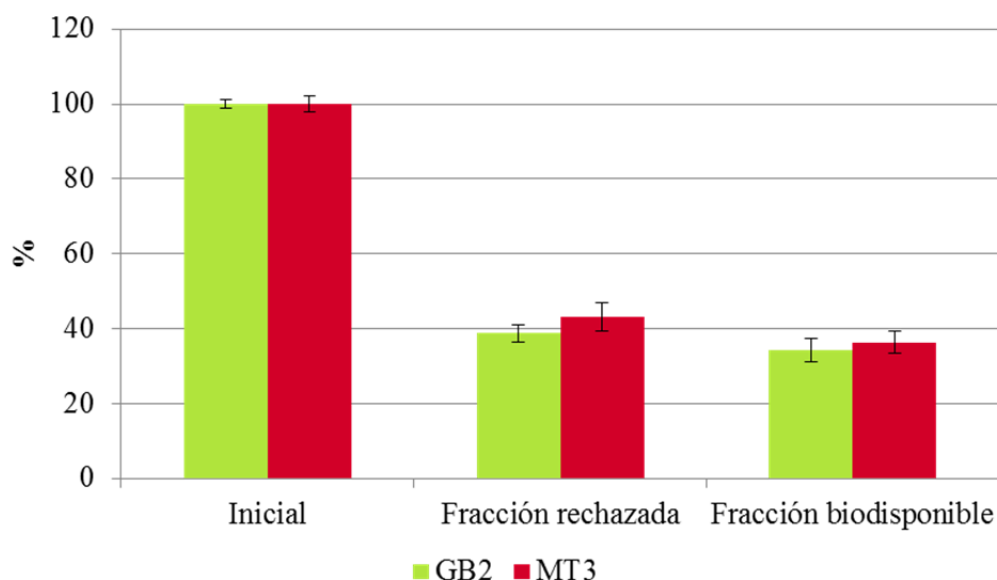


Figura 4.48. Porcentaje de actividad antioxidante absorbida por las células Caco-2.

De esta manera teniendo en cuenta la pérdida provocada por el proceso de digestión y por el paso por los enterocitos se puede cifrar la actividad antioxidante de la fracción biodisponible en un 29% y 32% respecto a la que originalmente presentaban los extractos GB2 y MT3, respectivamente. Por tanto, se pone de manifiesto que estos extractos resultarían adecuados para la elaboración de vinos o bebidas funcionales con actividad antioxidante.

Asimismo, estos datos se tuvieron en cuenta para la dosificación de los productos en los estudios *in vivo*, de tal manera que pudieran alcanzar valores potencialmente activos en dichos estudios.

4.2.2.2. Estudio de la actividad inflamatoria

Como complemento al estudio de la actividad antioxidante se llevó a cabo la medida del potencial bioactivo de los extractos sólido-líquido en cuanto a sus propiedades anti-inflamatorias, para valorar su posible implicación como reguladores de los mecanismos moleculares de mediación en procesos inflamatorios.

Estudio de toxicidad

Al igual que en los estudios de biodisponibilidad, como paso previo a los ensayos de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo el estudio de toxicidad de los extractos mediante el protocolo MTT. Este estudio permitió la determinación de la dosis máxima utilizable de los extractos a ensayar que no causaran toxicidad en el modelo celular THP-1/macrófagos. El estudio se realizó en presencia y ausencia de LPS y de LDL oxidadas. Ambos modelos se utilizan como medida de la activación de los mecanismos pro-inflamatorios en macrófagos (Chu y col., 2016; Kong y col., 2014). De los resultados obtenidos se determinó que la dosis máxima de extracto a aplicar se situó en 50 μ L para ambos tipos de extractos (GB2 y MT3) (Figura 4.49).

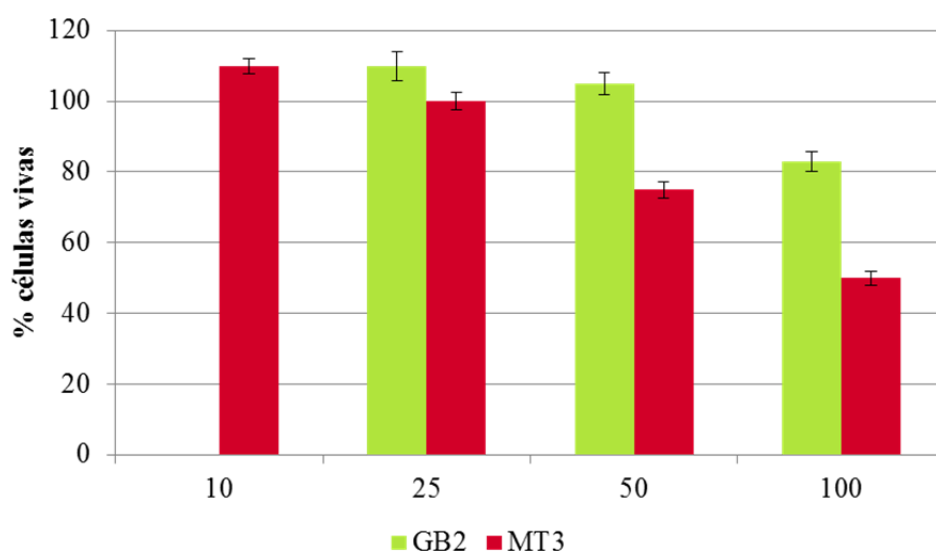


Figura 4.49. Ensayo de toxicidad en monocitos/macrófagos (% células vivas).

Actividad antiinflamatoria.

La medida de la actividad antiinflamatoria de los extractos sólido-líquido seleccionados para los estudios *in vivo* se llevó a cabo mediante el uso de macrófagos humanos de la línea THP-1. Se utilizó el modelo de inflamación mediado por LDLs, para lo cual se adición en el medio de cultivo lipoproteínas de baja densidad humanas oxidadas (LDLox) (Allen-Hall y col., 2007; Deliargyris y col., 2004)

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se midió la secreción al medio de cultivo de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 y la

antiinflamatoria IL-10, empleando la técnica ELISA tipo sándwich, utilizando 50 μ L de los extractos sólido-líquido utilizados en los estudios *in vivo* (GB2 y MT3). En todos los casos se utilizó un control positivo, con los macrófagos estimulados con LDLox en ausencia del extracto.

La adición de los extractos GB2 y MT3 provocó una atenuación muy significativa en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) en el modelo de inflamación en el que se incorpora al medio de cultivo de los macrófagos LPS (Figuras 4.50, 4.51 y 4.52).

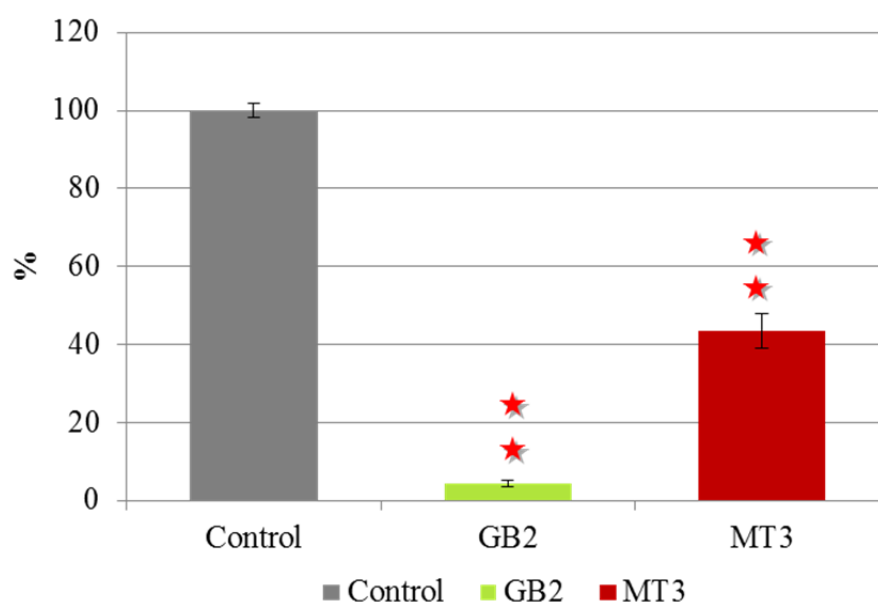


Figura 4.50. Porcentaje de producción de citoquina TNF- α de los extractos respecto al control ★ (p ≤ 0,01).

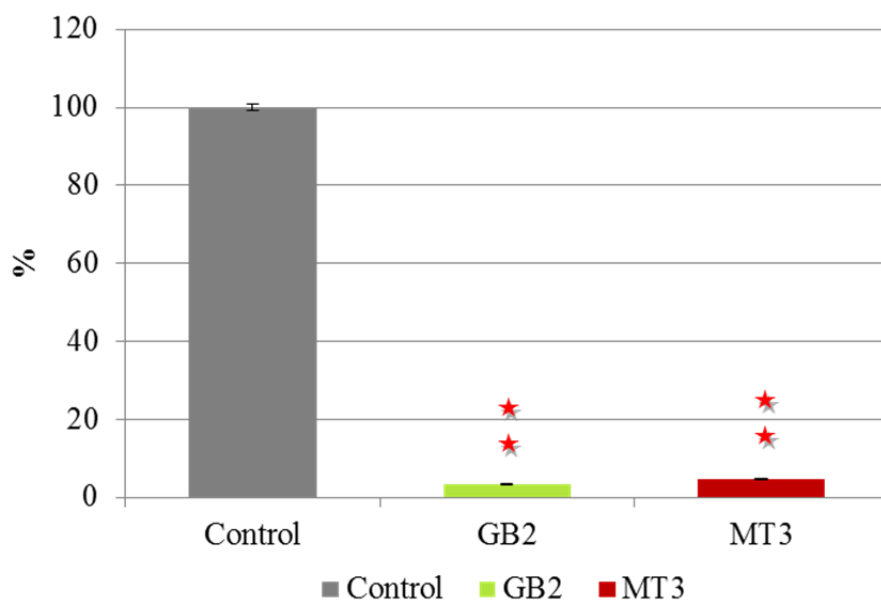


Figura 4.51. Porcentaje de producción de citoquina IL-1 β de los extractos respecto al control
 ★ (p ≤ 0,01)

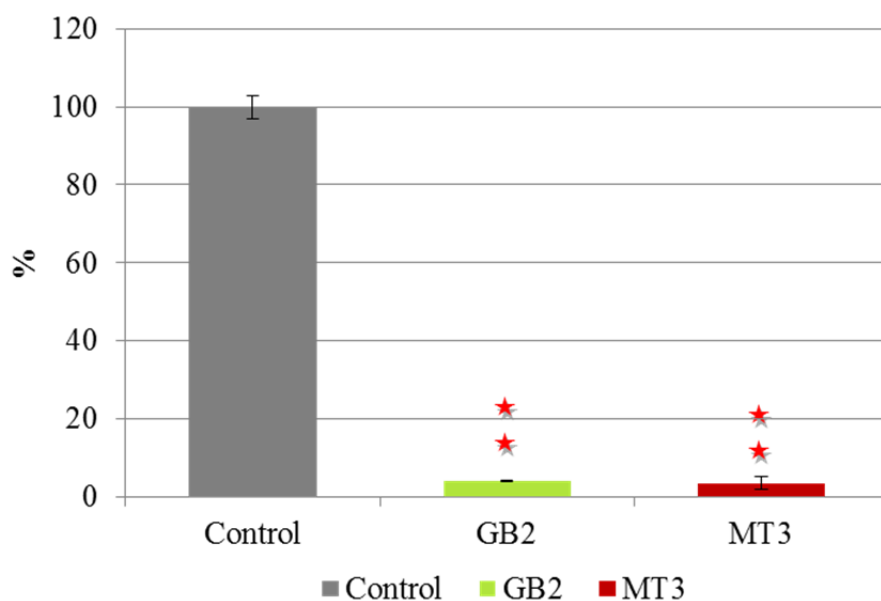


Figura 4.52. Porcentaje de producción de citoquina IL-6 de los extractos respecto al control
 ★ (p ≤ 0,01).

En ambos tipos de extracto, la liberación de TNF- α por los macrófagos en respuesta a la activación por LDLs oxidadas estaba fuertemente inhibida. Este hecho

produjo una disminución en las otras dos citoquinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-6, que se encuentran reguladas por TNF- α . De esta manera, la citoquina IL-1 β e IL-6 son liberadas por los macrófagos en respuesta a TNF- α , por lo que al disminuir drásticamente los niveles de esta última se produjo una disminución en la liberación de IL-1 β e IL-6.

Por tanto, los resultados sugieren una clara potencialidad de los extractos de hollejos para ejercer efectos antiinflamatorios a través de la supresión de la liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos por otros autores a partir de matrices vínicas (Castilla y col., 2006; Montagut y col., 2009; Zhang y col., 2011). En este sentido, diversos estudios ponen de manifiesto que el vino, por su composición fenólica, es capaz de reducir la inflamación mediada por las LDLox al regular la expresión del transportador de membrana CD36 o reducir los ROS generados por los macrófagos en procesos inflamatorios mediados por LDLox (Fuhrman y col., 2005; Gonzalez y col., 2011; Rosenblat y col., 2010).

De esta manera, los extractos estudiados podrían contribuir a la regulación de la respuesta antiinflamatoria del organismo y a su expresión génica, y por tanto contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas de base inflamatoria (ECBI). Con este propósito, el uso de estos extractos como nutracéuticos o su inclusión como ingredientes funcionales en alguna matriz alimentaria parece una opción muy plausible en grupos de riesgo cardiovascular, y en general para la mejora de las condiciones de salud de las personas sanas (Kaperonis y col., 2006; Wasaporn y col., 2010).

4.2.3. Estudio con animales

El principal objetivo del estudio con animales fue investigar el potencial efecto cardioprotector de dos prototipos de bebidas funcionales obtenidas a partir de hollejos de la variedad Garnacha Blanca, que poseían diferentes niveles de actividad antioxidante (7 eq T y 14 eq T). Asimismo, al extracto con un valor TEAC de 14 mmol Trolox/L se le añadió etanol hasta una concentración del 13% v/v (14 eq T EtOH), con el fin de poder compararlo con otros estudios de concentraciones

similares (Walzem, 2008). De esta manera, se evaluó el efecto que su consumo produjo sobre el perfil lipídico y glucídico plasmático, las medidas antropométricas de los animales, el estrés oxidativo, así como sobre la función endotelial utilizando un modelo animal de riesgo cardiovascular. En este sentido, el modelo animal utilizado se escogió con la intención de simular el efecto del consumo de estas bebidas funcionales sobre una población sana y joven expuesta a una dieta alta en colesterol y azúcares simples (habitual en los países occidentales), la cual a largo plazo puede desencadenar en la aparición de patologías cardiovasculares.

Para comprobar la ausencia de daño agudo se analizaron marcadores de riesgo avanzado, como la proteína C reactiva o marcadores de daño hepático. Asimismo, el volumen de bebida suministrado a los animales junto con el agua se calculó en función de las recomendaciones de un consumo moderado de alcohol (Saremi y col., 2008).

Tal y como muestran otros autores utilizando modelos similares, un incremento de colesterol y azúcares simples en la dieta puede modificar algunos parámetros metabólicos de riesgo temprano en desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Montilla y col., 2006; Slowing y col., 2001). En este sentido, Montilla y col., 2006) pusieron de manifiesto cómo el consumo de vino tinto redujo significativamente los niveles de colesterol plasmático asociados a una dieta alta en colesterol, de tal manera que asociaron este efecto protector a los compuestos fenólicos presentes en el vino.

4.2.3.1. Análisis antropométricos

Tras el periodo de adaptación (tiempo 0), los animales fueron pesados y se comprobó que no hubiera diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Transcurridas las 12 semanas de estudio, los animales se pesaron nuevamente como paso previo a su sacrificio. Tal y como se muestra en la Tabla 4.31 al comienzo del estudio los animales utilizados en los distintos grupos no presentaban diferencias significativas de peso entre ellos. Una vez transcurridas las 12 semanas de estudio se encontraron unos incrementos medios de peso de entre 86 y 98,5 g/animal. Sin embargo, este incremento fue similar en todos los grupos estudiados, de tal manera que no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Figura 4.53).

Tabla 4.31. Incremento total y parcial del peso de los animales durante la intervención.

| | Control | 7 eq T | 14 eq T | 14 eq T EtOH |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Δ peso total (g) | 98,50 ± 28,95 | 88,50 ± 12,77 | 98,13 ± 21,27 | 86,00 ± 23,69 |
| Δ peso/semana | 8,21 ± 1,86 | 7,38 ± 0,95 | 8,18 ± 1,46 | 7,17 ± 1,17 |

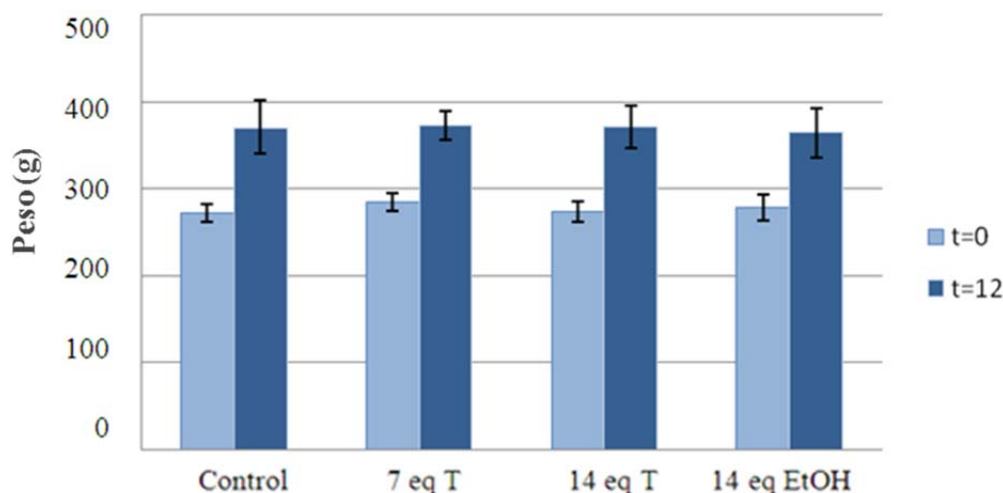


Figura 4.53. Evolución de los pesos medios durante la intervención. Datos expresados en gramos, medidos en tiempo 0 (barras azul clara) y tras 12 semanas (barras azul oscuro).

Los resultados obtenidos correspondientes a los pesos del corazón, aorta, riñón e hígado no mostraron grandes diferencias interindividuales (datos no mostrados). Sin embargo, los pesos del tejido adiposo correspondiente a los depósitos retroperitoneales variaron considerablemente entre los distintos animales, desde los 6 gramos a los casi 15 recogidos en uno de los animales. Como se aprecia en la Figura 4.54, estas diferencias se reflejaron en elevadas desviaciones estándar, lo que dio lugar a que no se encontraran diferencias significativas entre los distintos grupos. De esta manera, se puede concluir que no se observaron diferencias en las medias antropométricas realizadas asociadas a ninguna de las bebidas en comparación con el grupo control transcurridas 12 semanas desde el comienzo del estudio.

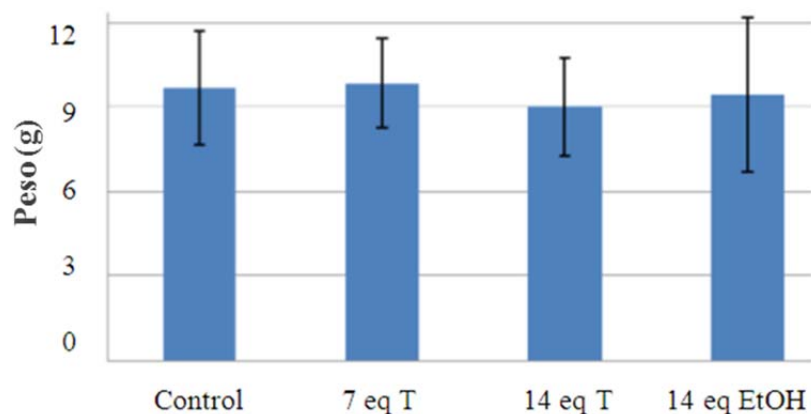


Figura 4.54. Peso medio del tejido adiposo retroperitoneal.

4.2.3.2. Marcadores metabólicos

A continuación se procedió al estudio de marcadores metabólicos específicos como son: el perfil lipídico plasmático, la relación LDL/HDL y el perfil glucídico.

Perfil lipídico plasmático

En la Figura 4.55 se muestran los niveles de triglicéridos (TG) y lipoproteínas (HDL y LDL respectivamente), así como el contenido en colesterol total en el plasma de los animales tras la intervención dietética.

Los resultados mostraron que la concentración de LDL plasmática del grupo 14 eq T, fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) al resto de grupos (grupo control, grupo 7 eq T y grupo 14 eq T EtOH).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol total, colesterol HDL y TG. Sin embargo, se observó una ligera tendencia a aumentar las concentraciones de HDL de manera dosis dependiente a la concentración de antioxidantes de la bebida y una tendencia más evidente en el descenso de las LDL.

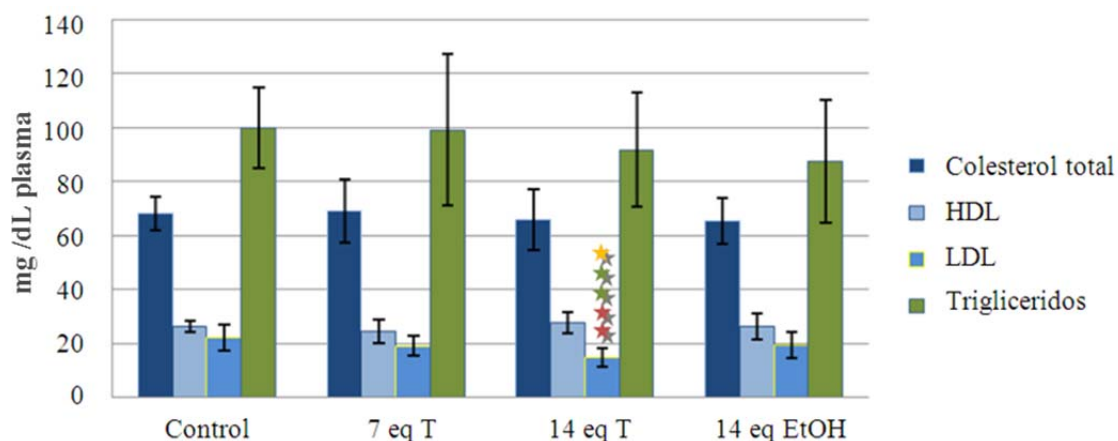


Figura 4.55. Concentración de lípidos plasmáticos tras la intervención.

Diferencias respecto al grupo control ★ (p ≤ 0,05), 7 equivalentes Trolox ★ (p ≤ 0,05) y 14 equivalentes Trolox con EtOH ★ (p ≤ 0,1).

De esta manera, en base a las concentraciones de lípidos plasmáticos obtenidos, se calculó el índice LDL/HDL puesto que dicho índice predice con mayor precisión el riesgo cardiovascular que las medidas independientes correspondientes al perfil lipídico (Millan y col., 2009). Como se muestra en la Figura 4.56, la relación LDL/HDL fue significativamente menor en los animales tratados con la bebida de 14 eq T respecto al grupo control. Esta reducción se debió principalmente a la reducción de la concentración del colesterol LDL (con efecto aterogénico) más que a un incremento en la cantidad del colesterol HDL (con efecto antiaterogénico). Este efecto se encuentra en consonancia con el mostrado por otros estudios donde se probó el efecto antiaterogénico de diferentes alimentos y bebidas ricos en compuestos fenólicos (Lecumberri y col., 2007; Raldl y col., 2007; Franzini y col., 2010).

Por otro lado, uno de los objetivos secundarios de este estudio fue comparar el efecto de la diferente capacidad antioxidante de la bebida estudiada (7 y 14 equivalentes Trolox) sin tener en cuenta el posible efecto del etanol.

En este sentido, se observó que las concentraciones de colesterol total fueron muy similares entre ambos grupos y el control. Sin embargo, los datos mostraban una ligera tendencia a aumentar las concentraciones de HDL de manera dosis dependiente a la concentración de antioxidantes de la bebida y una tendencia más evidente en el descenso de las LDL.

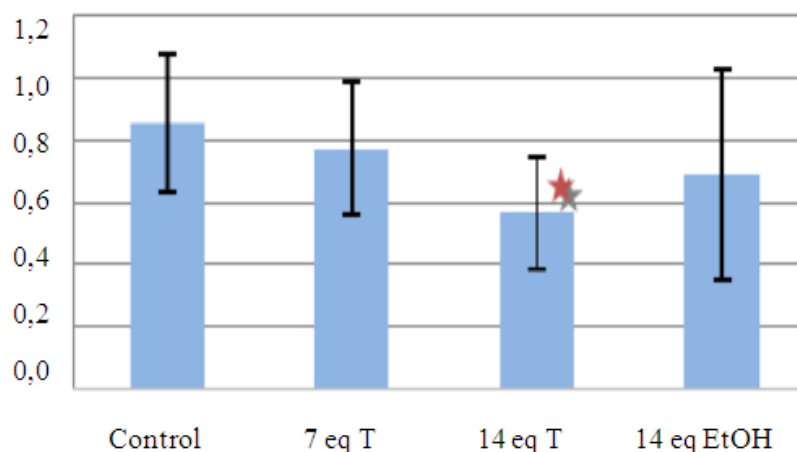


Figura 4.56. Relación LDL/HDL.

Diferencias respecto al grupo control* ($p \leq 0,05$).

Para comprobar el efecto dependiente de la dosis de compuestos fenólicos en la relación LDL/HDL, se correlacionaron los valores finales de LDL y HDL con la concentración de antioxidantes de la bebida (Figura 4.57), situando en las ordenadas los equivalentes Trolox y en las abscisas las concentraciones de lipoproteínas. Se observó una relación directamente proporcional respecto a la concentración de HDL e inversamente proporcional respecto a las LDL. La pendiente de la línea de tendencia fue más pronunciada en la relación de las LDL que en las HDL ($b = -0,521$ y $b = 0,104$). Los coeficientes de correlación fueron más altos en la recta de LDL que en las HDL ($R^2 = 0,401$, y $R^2 = 0,028$, respectivamente).

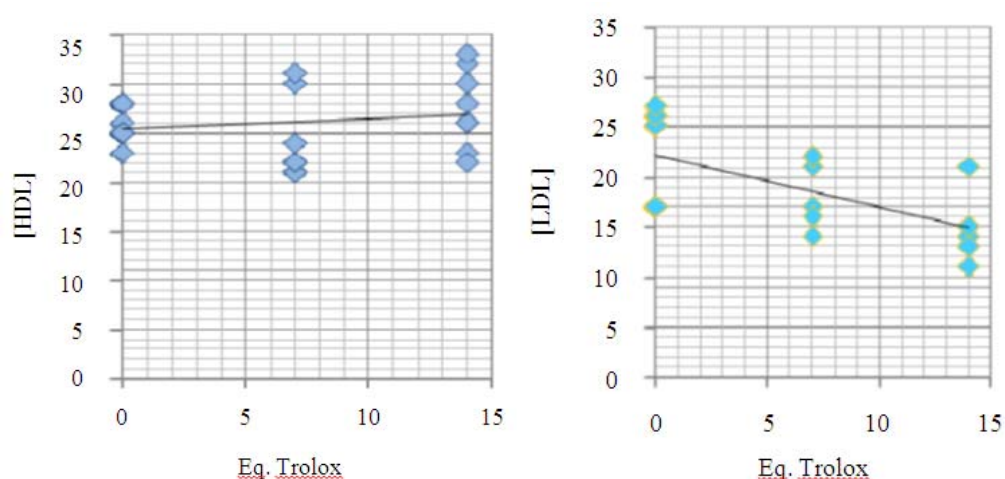


Figura 4.57. Correlación entre las concentraciones de HDL y LDL plasmático con la capacidad antioxidante de las bebidas. Cálculos en base a los grupos: control, 7 eq T y 14 eq T

Como era de esperar, se observó un efecto dependiente de la actividad antioxidante en el índice LDL/HDL, siendo el descenso $b=0,104$ y el coeficiente de correlación $R^2 = 0,291$, tal y como se indica en la Figura 4.58.

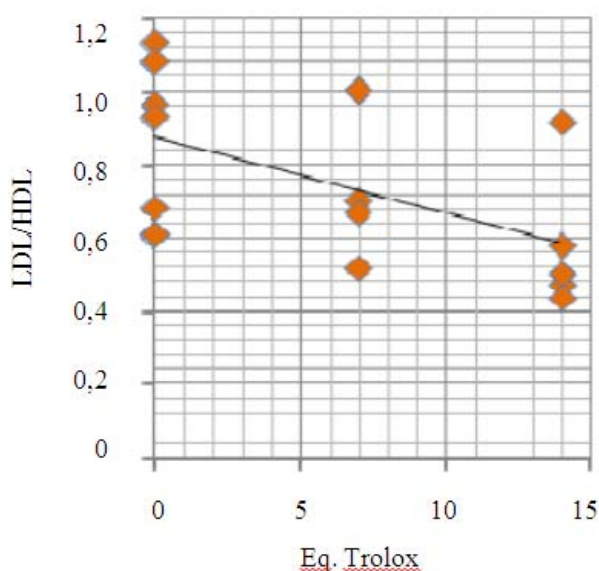


Figura 4.58. Correlación entre índice LDL/HDL y la capacidad antioxidante de las bebidas. Cálculos en base a los grupos: control, 7 eq T y 14 eq T.

En resumen, se observó una relación dosis/efecto entre la regulación de las concentraciones de lipoproteínas (aumento de HDL, descenso del LDL y relación LDL/HDL), siendo más efectiva 14 equivalentes Trolox que 7 equivalentes Trolox.

En las mismas muestras se analizó el contenido en ácidos grasos no esterificados, que, a diferencia de los niveles de TG y colesterol, son lípidos liberados exclusivamente por el tejido adiposo. El análisis estadístico de los resultados (Figura 4.59) reveló que no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma entre ninguno de los grupos respecto al grupo control. Sin embargo, sí se encontró una correlación inversa entre la concentración de triglicéridos en plasma y la capacidad antioxidante de la bebida estudiada ($r = -0,54$; $p < 0,05$).

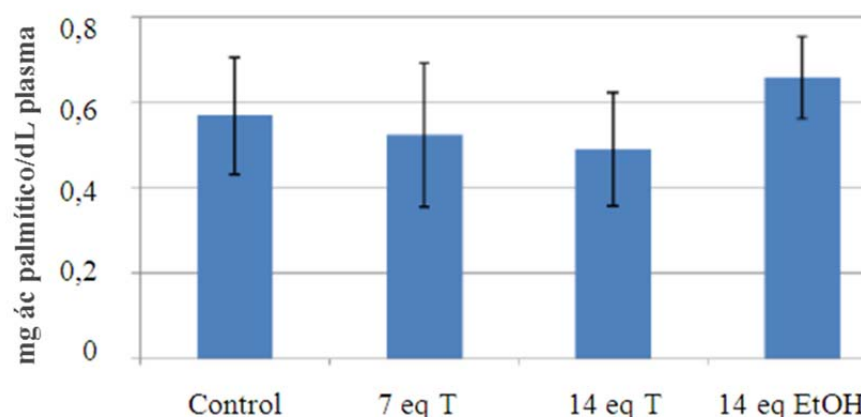


Figura 4.59. Concentración de ácidos grasos libres en plasma.

Conviene recordar que la obesidad está asociada con altos niveles de TG y ácidos grasos de cadena corta (SCFA), junto con un incremento en los depósitos de TG en los tejidos grasos, especialmente en el hígado. De esta manera, los niveles continuados de TG y SCFA plasmáticos se encuentran asociados con fallos en el metabolismo, resistencia a la insulina y, por tanto, diabetes, lo que se asocia a complicaciones cardiovasculares (Saremi y col., 2008)).

Perfil glucídico

Asimismo, se analizaron las concentraciones de glucosa plasmática de los animales tras el tratamiento. Como se puede observar en la Figura 4.60 la adición de etanol al grupo 14 eq T provocó una disminución del nivel de glucosa en plasma, mientras que este efecto no se produjo en ninguno de los otros dos grupos.

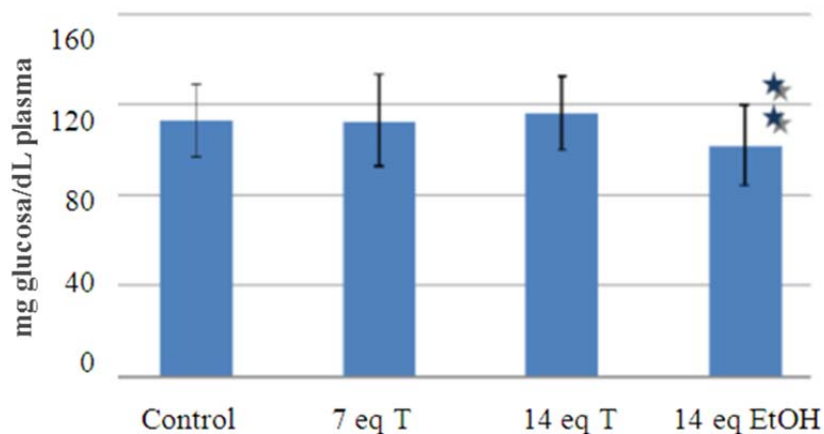


Figura 4.60. Concentración de glucosa en plasma

Diferencias respecto al grupo 14 equivalentes Trolox ★ ($p \leq 0,05$).

4.2.3.3 Marcadores de estrés oxidativo

Asimismo, se realizó un estudio de marcadores de estrés oxidativo en plasma, así como en tejidos grasos tales como hígado, riñón y tejido adiposo (grasa retroperitoneal). Para ello, se determinaron las concentraciones de peróxidos lipídicos como especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Conviene recordar que dentro de los componentes celulares, los lípidos son las macromoléculas más susceptibles a sufrir daños como consecuencia de condiciones prolongadas de estrés oxidativo.

El proceso de oxidación lipídica se encuentra caracterizado por una serie de reacciones en cadena (peroxidación lipídica) cuyos productos de reacción (peróxidos) son a su vez capaces de propagar las reacciones de oxidación entre otros lípidos u otras biomoléculas adyacentes susceptibles de oxidación, tales como ácidos nucleicos o proteínas.

En este sentido, el compuesto de oxidación de lípidos más estudiado y representativo es el malondialdehído (MDA), para el que se ha establecido una relación directa entre sus niveles plasmáticos y el riesgo cardiovascular. En este estudio, se analizaron de manera global los productos finales de oxidación lipídica, como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, expresándose los resultados en mmol de MDA/ μ g de proteína (en tejidos) o mL (en suero sanguíneo).

Peroxidación lipídica sistémica

Para determinar el efecto de las bebidas estudiadas en el estatus oxidativo global del modelo animal se analizaron las concentraciones de equivalentes de MDA en los plasmas recolectados tras 12 semanas de tratamiento. Los resultados se resumen en la Figura 4.61.

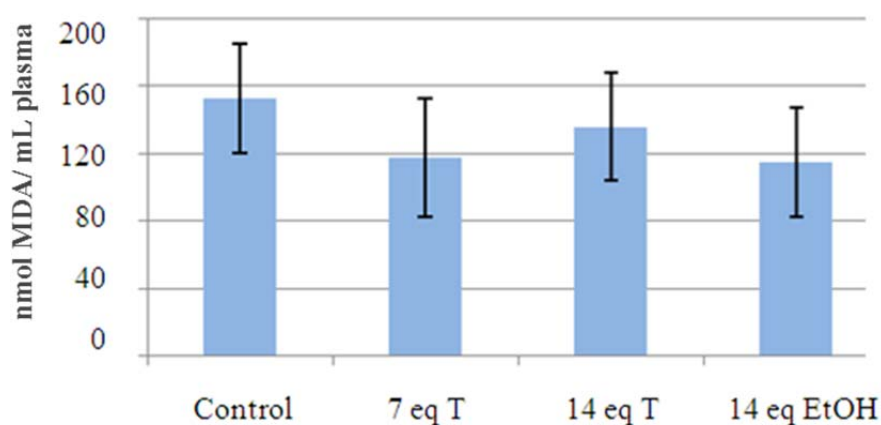


Figura 4.61. Peroxidación lipídica en muestras de suero.

Todos los grupos tratados mostraron valores medios de peroxidación lipídica inferiores al control, aunque no de forma significativa.

Peroxidación lipídica en tejidos diana

A continuación se llevó a cabo el análisis de los niveles de equivalentes de MDA en tejidos (adiposo, hepático y renal) caracterizados por su alto contenido en lípidos, aunque con funciones metabólicas muy diferentes entre sí.

Respecto a los niveles de peroxidación lipídica registrados en tejido adiposo (Figura 4.62), se observó un descenso a nivel de grasa retro peritoneal. Sin embargo, dada la alta variabilidad de los resultados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

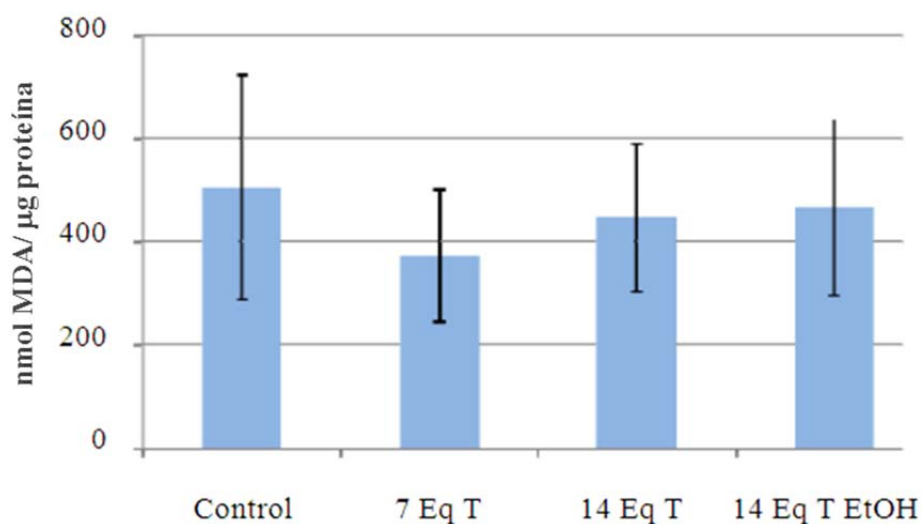


Figura 4.62. Niveles de peroxidación lipídica en tejido adiposo.

Por otro lado, los niveles de peroxidación lipídica detectados en hígado (Figura 4.63) presentaron ligeras diferencias entre los distintos grupos. De esta manera, el grupo de 7 eq T y 14 eq T mostraron menores niveles de MDA respecto al grupo control y al grupo 14 eq T EtOH aunque de forma no significativa.

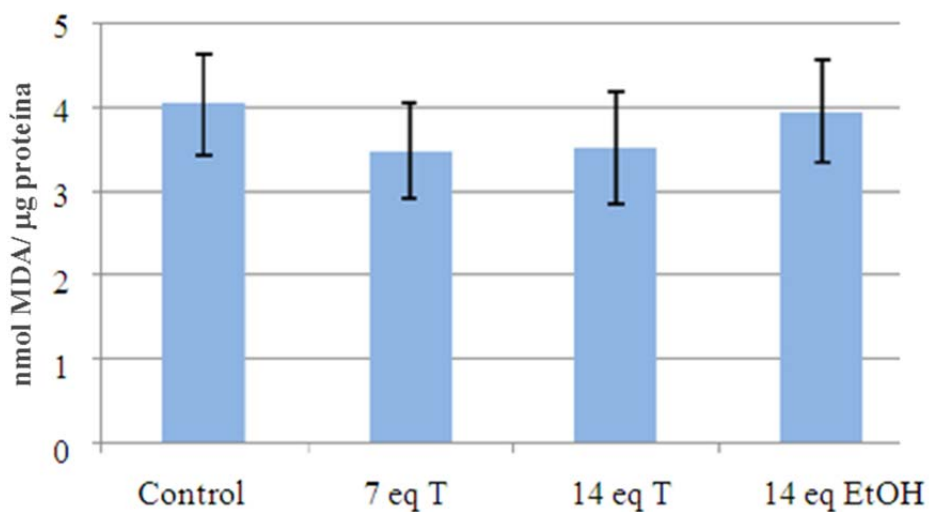


Figura 4.63. Niveles de peroxidación lipídica en hígado.

Asimismo, se encontró una relación inversa entre la capacidad antioxidante de la bebida y la peroxidación lipídica en riñón ($r = -0,324$) e hígado ($r = -0,336$), aunque no de forma significativa ($p = 0,054$ y $p = 0,062$, respectivamente).

Respecto a los niveles de peroxidación lipídica en los riñones de los distintos grupos de animales tratados (Figura 4.64), se observó un descenso en su concentración en el grupo tratado con la bebida de 14 eq T respecto al grupo control ($p \leq 0,1$) y respecto al grupo que consumió la bebida de 7 eq de Trolox ($p \leq 0,01$). De esta manera, la reducción de la formación de peróxidos lipídicos a nivel renal por parte de la bebida de 14 equivalentes Trolox, puede tener asociado un beneficio en la prevención temprana de enfermedades cardiovasculares y mejora de la función renal.

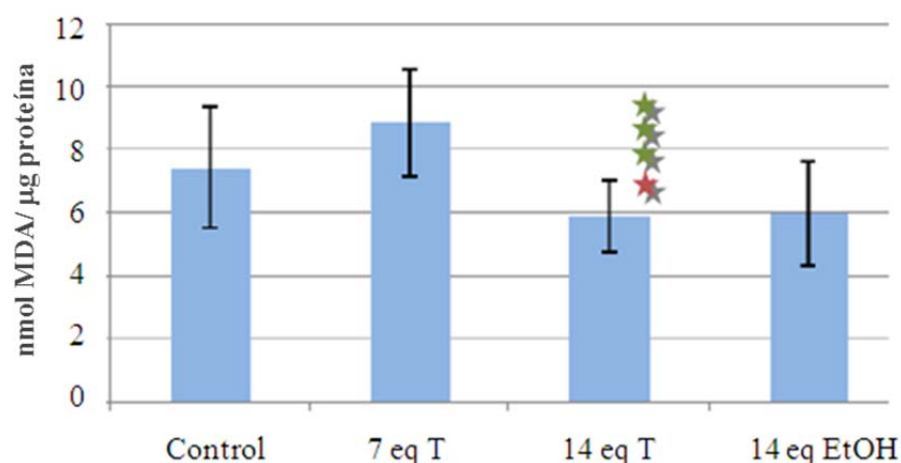


Figura 4.64. Niveles de peroxidación lipídica en riñón.

Diferencias respecto al grupo control ★($p \leq 0,1$), 7 equivalentes Trolox ☆($p \leq 0,01$).

El riñón es un órgano clave en la regulación hemostática y en el mantenimiento de la presión arterial. Debido a la composición en ácidos grasos de su membrana, rico en ácidos grasos poliinsaturados, este tejido es especialmente susceptible de ser oxidado. Esta oxidación desencadena una reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica caracterizada por la producción constante de radicales libres. Como se observa en la Figura 4.65, los radicales libres activan distintas rutas metabólicas que modulan la función microvascular renal. El estrés

oxidativo en general y la existencia de especies reactivas de oxígeno, en particular, se han relacionado con un aumento del tono vascular renal, con la sensibilidad a vasoconstrictores y con la disfunción endotelial y tubuloglomerular. Estos efectos conllevan a largo plazo un fallo en el sistema tamponador, liberando vasopresores renales, como angiotensina II y endotelina I, que tienen un efecto negativo a nivel hemodinámico. Por lo tanto, la peroxidación renal supone un importante factor de riesgo cardiovascular (Lerman y col., 2009). De esta manera, la protección antioxidante a nivel renal resulta especialmente relevante en la prevención cardiovascular, donde el consumo moderado de vino se ha propuesto como un hábito potencialmente beneficioso para los pacientes con enfermedad renal (Presti y col., 2007).

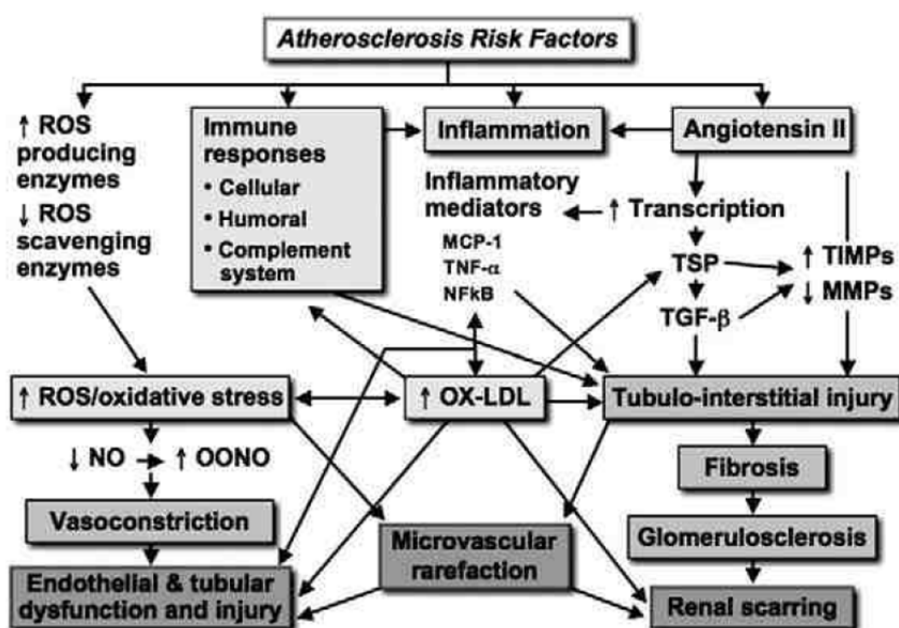


Figura 4.65. Inter relación entre daño oxidativo renal y aterosclerosis (Lerman y col., 2009). La producción de especies reactivas de oxígeno en riñón está relacionada con procesos ateroscleróticos.

En este sentido, las propiedades cardioprotectoras de alimentos ricos en compuestos fenólicos como el vino se encuentran, en parte, relacionadas con su potencial para contrarrestar el estrés oxidativo. Pérez-Jiménez y col., 2010), pusieron de manifiesto la capacidad para proteger a los órganos grasos contra la peroxidación

lipídica tras una ingestión aguda o a largo plazo de este tipo de compuestos. Asimismo, diversos estudios llevados a cabo en modelos animales observaron descensos en el nivel de peroxidación lipídica en riñón tras la ingesta de vino tinto, y de forma proporcional a la capacidad antioxidante *in vitro* de los vinos analizados (Montilla y col., 2006; Rodrigo y col., 2005b), en consonancia con los resultados mostrados en la presente memoria.

4.2.3.4 Marcadores de función endotelial

Una vez realizado el estudio de la peroxidación lipídica en órganos diana, se llevó a cabo el estudio de marcadores de función endotelial.

El efecto de las bebidas en la producción de óxido nítrico se determinó mediante una medida indirecta (concentración de Nitritos tisular), junto con una medida directa, como es, la expresión génica de la enzima inducible en la producción de óxido nítrico (iNOS).

Medida indirecta de óxido nítrico en aorta y corazón

Como medida indirecta del óxido nítrico, se determinaron las concentraciones de nitritos totales en homogenizados de aorta y corazón de los animales de experimentación. La Figura 4.66 muestra los resultados obtenidos en homogenizados de aorta.

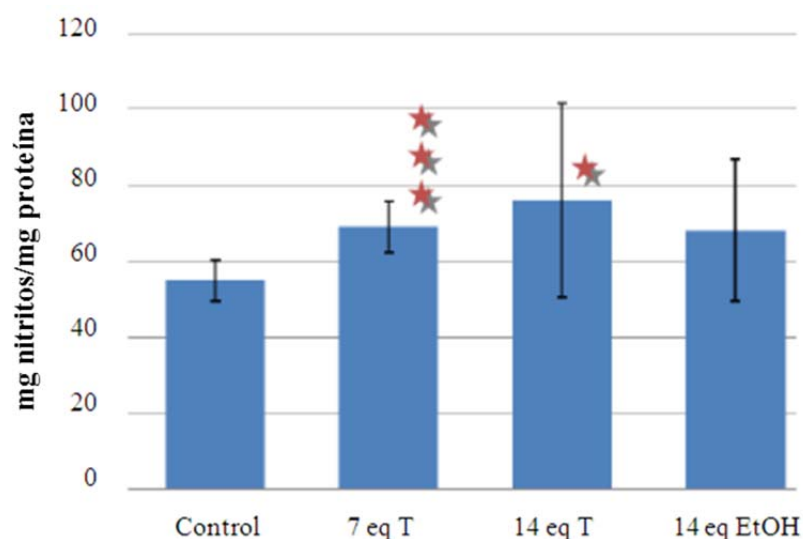


Figura 4.66. Concentración de nitritos en aorta.

Diferencias respecto al grupo control★ (p ≤ 0,1) y ★★★ (p ≤ 0,01).

Los grupos de animales tratados con la bebida de 7 equivalentes Trolox y 14 eq T presentaron un aumento significativo de la cantidad de nitritos en el homogenizado de aorta con respecto al grupo control, siendo más significativo en el primer grupo (bebida de 7 eq T). Además, se encontró una correlación directa entre la capacidad antioxidante de la bebida y la concentración de óxido nítrico ($r = -0,514$; $p < 0,05$).

Respecto a la determinación de la concentración de nitritos en corazón (Figura 4.67), en general, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y cada uno de los grupos tratados. Sin embargo, los valores de nitritos en tejido cardíaco observados en el grupo de animales a los que se les suministró la bebida con 14 equivalentes Trolox, fueron significativamente mayores que los observados en el resto de grupos.

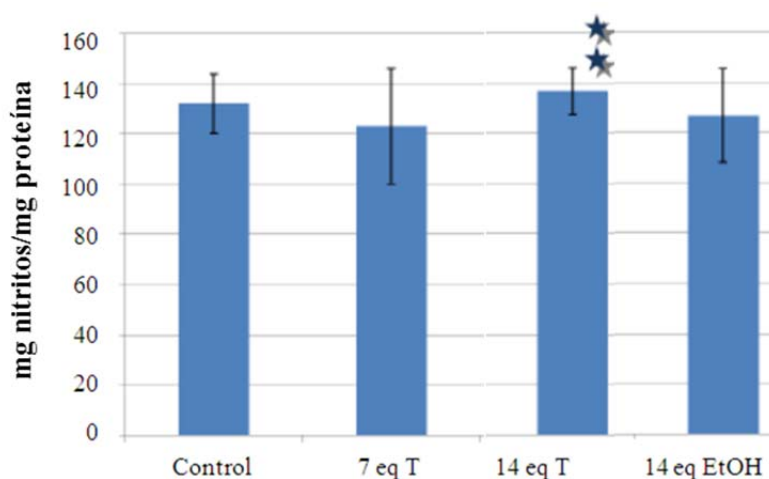


Figura 4.67. Concentración de nitritos en corazón.

Diferencias respecto al grupo 14 equivalentes Trolox ★★ ($p \leq 0,05$).

Conviene recordar que el endotelio se define como la capa de células que recubre los vasos sanguíneos. Por su localización y su actividad metabólica juega un papel clave en la homeostasis vascular, regulando la presión sanguínea, previniendo la formación de trombos y la formación de placas de ateroma. La disfunción del endotelio ocurre desde etapas tempranas del fallo cardiovascular, por lo que los biomarcadores de función endotelial constituyen una herramienta importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Andriambeloson y col., 1998).

Por otro lado, el endotelio está en contacto directo con el torrente sanguíneo por lo que es susceptible de ser activado o modulado por diversas señales internas o externas. El endotelio es un sensor y transductor de los cambios en la circulación, y un generador de numerosos mediadores biológicos involucrados. Entre las funciones del endotelio destacan la regulación del tono vasomotor, el sistema de coagulación y trombosis y su papel en el crecimiento y migración de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos. En este sentido, se considera al óxido nítrico como el principal regulador de estas funciones (Endemann y Schiffrin, 2004; Kawashima y col., 2004; Durand y Gutterman, 2013).

Expresión génica de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en aorta

Como complemento al estudio de nitritos en aorta y corazón se llevó a cabo el estudio de la expresión génica de la enzima iNOS en aorta. Para lo cual, se extrajo y purificó el contenido en mRNA de las muestras de aorta de los animales estudiados. Tras su conversión en cDNA mediante PCR en presencia de retrotranscriptasa, las copias codificantes de iNOS (o NOS2) fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real. Como gen de referencia se utilizó S26, que es constitutivo de la célula, por lo que su concentración no sufre ninguna variación con independencia del tratamiento ejercido. En la Figura 4.68 se puede observar cómo el consumo de ambas bebidas (7 eq T y 14 eq T) produjo un aumento en la expresión génica de iNOS en las aortas de los animales respecto al grupo control ($p < 0,05$). Asimismo, se observó una correlación lineal entre el aumento de la expresión génica de iNOS y la actividad antioxidante de la bebida estudiada, lo que explicaría el incremento producido de NO.

Estos resultados se encuentran en consonancia con otros estudios donde se ha puesto de manifiesto la capacidad para modular el endotelio que ejercen diversos metabolitos derivados de los compuestos fenólicos presentes en la dieta, y de esta manera, ejercer un efecto vasodilatador (Fitzpatrick y col., 1993). En este sentido, el mecanismo de acción no está relacionado con la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos para captar radicales libres, sino con un incremento en la síntesis de óxido nítrico en la células endoteliales (Andriambeloson y col., 1997; Andriantsitohaina y col., 1999). Dichos metabolitos son transportados por el torrente sanguíneo estimulando la síntesis de óxido nítrico en el endotelio, el cual difunde

hacia la zona basal celular que descansa sobre la musculatura lisa que rodea los vasos. En respuesta al óxido nítrico se produce una relajación muscular, y por tanto una vasodilatación que lleva asociada un descenso en la presión arterial (Perez-Vizcaino y col., 2006; Loke y col., 2008; Auger y col., 2011).

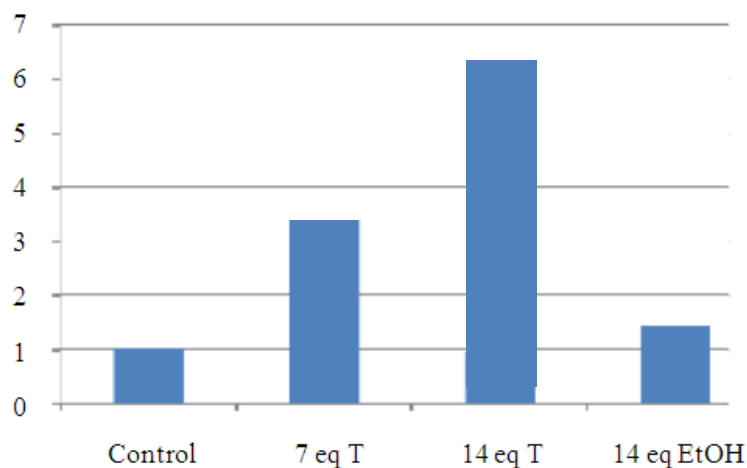


Figura 4.68. Expresión génica de iNOS en aorta.

Valores en unidades relativas a grupo control. Número de copias iNOS/S26. Barras de error no mostradas.

4.2.3.5 Otros marcadores de riesgo cardiovascular

A continuación se procedió al estudio de otros marcadores de riesgo cardiovascular como son la proteína C reactiva y la medida del daño celular.

En este sentido, los niveles de proteína C reactiva analizados en el plasma de los animales tras la intervención se mantuvieron, en todos los casos, por debajo del límite de detección (datos no mostrados).

En cuanto a los niveles de transaminasas plasmáticas (GGT y GPT), bilirrubina, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa éstos fueron analizados como marcadores de posible daño hepático. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas entre los grupos tratado, de tal manera que los valores se mantuvieron en los límites de la normalidad (datos no mostrados).

Por tanto, se puede concluir que ninguno de los productos analizados, así como la dieta suministrada, mostraron signos de hepatotoxicidad ni incrementaron los niveles de proteína C reactiva.

4.2.3.6 Efecto en sub-poblaciones

Tal y como se comentó en el capítulo de materiales y métodos, el modelo animal utilizado fue sometido a un leve estrés nutricional, elevando el contenido de colesterol y azúcares en la dieta, pero manteniéndolos dentro de unos límites fisiológicos. Este modelo representaría a una población sana y joven con una alimentación no equilibrada. Sin embargo, diversos autores proponen que el efecto protector de los antioxidantes de la dieta es más marcado en poblaciones que, sin alcanzar el grado de patología, presentan uno o varios factores de riesgo. Para evaluar este efecto, se realizó un estudio estadístico tomando como muestra un subgrupo de cada grupo experimental correspondiente a los animales que se encontraban por encima del percentil 40 en los niveles de glucosa, colesterol total y concentración en plasma de TBARS.

Sub-población glucosa >P₄₀

Las concentraciones de glucosa plasmática variaron desde 123,4 (control), 131 (7 eq T), 128,4 (14 eq T) a 108,6 (14 eq T EtOH). En este subgrupo se observó un descenso significativo de los niveles de TBARS en plasma en el subgrupo de las bebidas 14 equivalentes Trolox con y sin etanol, mientras que este efecto no se observó al estudiar la población general (Figura 4.69).

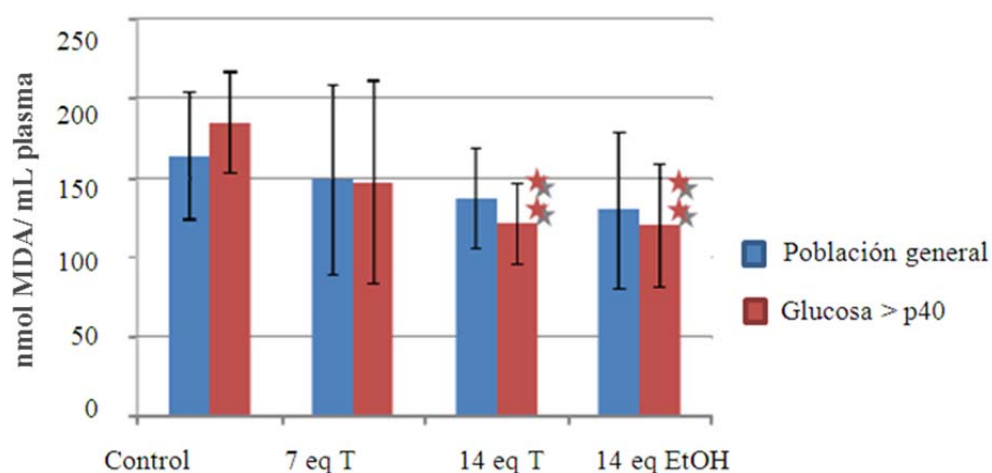


Figura 4.69. Peroxidación lipídica en suero.

Diferencias respecto al grupo control ★(p ≤ 0,05).

Diversos autores han asociado la hiperglicemia plasmática con elevados niveles de estrés oxidativo sistémico. Este efecto se ha descrito tanto en individuos

con diabetes tipo II (Kawahito y col., 2009) como en animales de experimentación (Novelli y col., 2007). El efecto de los compuestos fenólicos presentes en las bebidas contrarrestaría el incremento producido en el estrés oxidativo sistémico como consecuencia de una dieta rica en azúcares, reduciendo la concentración de peróxidos lipídicos, especies altamente reactivas, que además de ser marcadores de oxidación, en sí mismas son moléculas pro-oxidantes. El incremento de especies pro-oxidantes retroalimenta el daño, acelerando los procesos degenerativos asociados a la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.

En ese sentido, las bebidas analizadas en este estudio podrían tener un efecto especialmente protector en estados no avanzados de intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina.

Sub-población colesterol >P₄₀

Asimismo, se comparó el efecto de las bebidas en la muestra de animales con niveles de colesterol total plasmático por encima del percentil 40 en cada grupo experimental. Las concentraciones de colesterol total plasmática variaron entre 71,4 (control), 72,6 (7eq T), 78,2 (14 eq T) y 78,2 (14 eq T EtOH). No se observaron diferencias significativas respecto a los niveles de colesterol total entre los grupos. Sin embargo, en los otros parámetros analizados se observaron diferencias previamente estipuladas al comparar la población general y nuevas diferencias específicas de este subgrupo.

En la Figura 4.70 se resumen los resultados obtenidos al analizar los niveles de HDL plasmáticas.

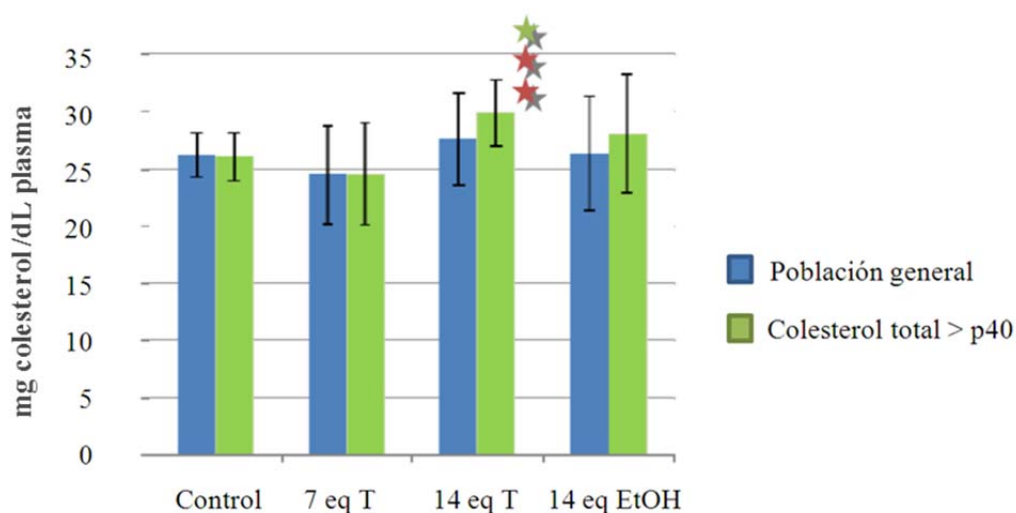


Figura 4.70. Concentraciones de HDL en plasma.

Diferencias respecto al grupo control ★ ($p \leq 0,05$) y 7 equivalentes Trolox ★ ($p \leq 0,1$).

Los niveles plasmáticos de HDL fueron significativamente más elevados en el grupo de la bebida con 14 eq T respecto al grupo control ($p < 0,05$) y el grupo de 7 equivalentes Trolox ($p < 0,1$). Estas lipoproteínas son de especial importancia en el control de la homeostasis del colesterol, ya que lo transportan desde los tejidos al hígado, donde es almacenado o metabolizado para la síntesis de ácidos biliares u hormonas. Por este motivo se han desarrollado nuevas terapias centradas en el incremento de los niveles de HDL en la prevención cardiovascular (Kontush y col., 2008). En este sentido, la bebida funcional de 14 eq T puede jugar un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares incrementando los niveles de HDL en estados de hipercolesterolemia moderada.

En la misma línea, al comparar los valores de triglicéridos en plasma se observó un descenso significativo en su concentración respecto al grupo control ($p < 0,1$) en el subgrupo de animales de colesterol elevado que tomaron la bebida con 14 equivalentes Trolox (Figura 4.71).

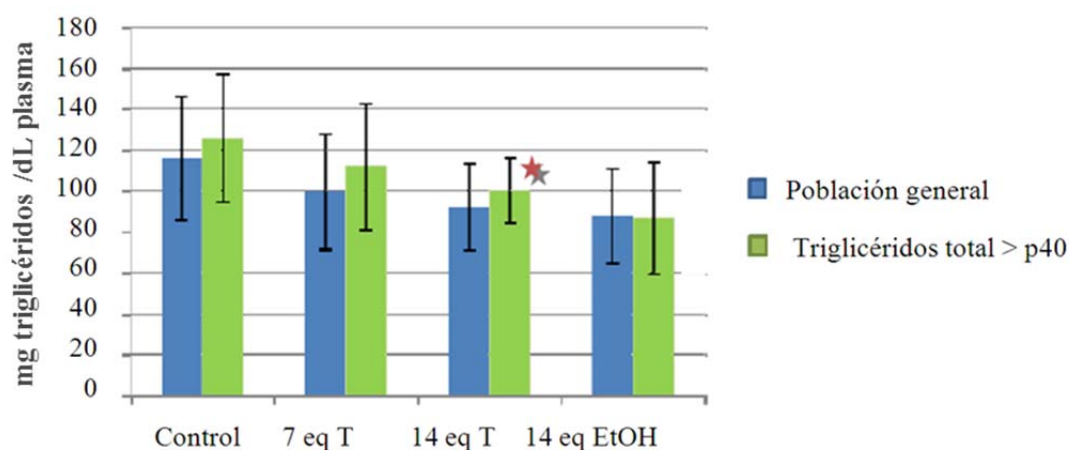


Figura 4.71. Concentraciones de triglicéridos en plasma.

Diferencias respecto al grupo control ★ ($p \leq 0,1$).

Sub-población TBARS en plasma >P₄₀

Por otro lado, se comparó el efecto de las bebidas en la muestra de animales con niveles de TBARS plasmática por encima del percentil 40 en cada grupo

experimental. Las concentraciones de TBARS plasmático, expresados en equivalentes de MDA, variaron desde 182,2 (control), 169,9 (7 eq T), 154,9 (14 eq T) a 151,8 (14 eq T EtOH). No se observaron diferencias significativas respecto a los niveles de colesterol total entre los grupos. Sin embargo, en los otros parámetros analizados se observaron diferencias previamente observadas al comparar la población general y nuevas diferencias específicas de este subgrupo (Figura 4.72).

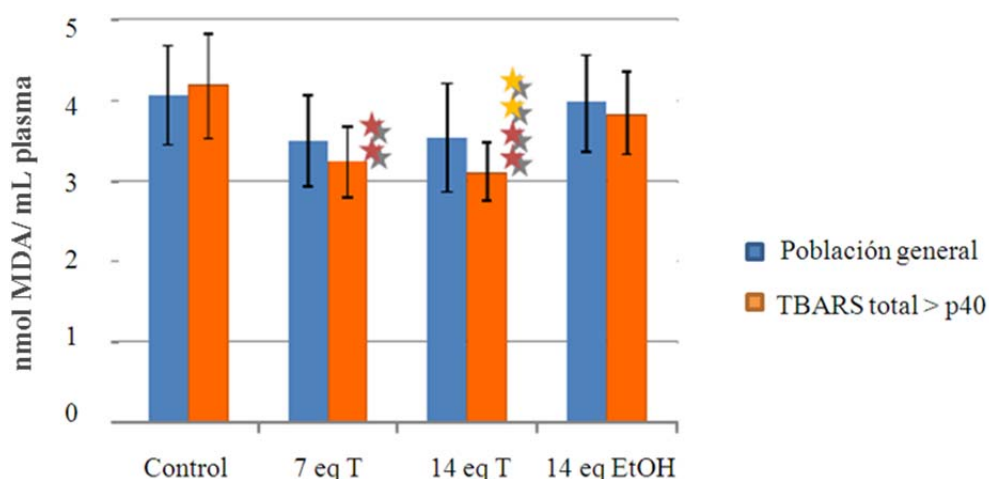


Figura 4.72. Peroxidación lipídica en plasma.

Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al grupo control * y equivalentes Trolox con EtOH *.

Respecto a los niveles de peróxidos en tejido adiposo, se observó un descenso estadísticamente significativo de los mismos en los animales tratados con las bebidas de 7 y 14 equivalentes Trolox respecto al grupo control ($p \leq 0,05$). Además, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las bebidas de 14 equivalentes Trolox con y sin alcohol, siendo los marcadores de oxidación menores en la de sin alcohol.

Como indica la Figura 4.73, se observó un descenso en la producción de peróxidos lipídicos a nivel de tejido adiposo en los animales tratados con la bebida de 7 equivalentes Trolox respecto al control ($p \leq 0,05$). Esto, junto con el hecho del descenso de producción de peróxidos en tejido renal, ya observado en la población general, hace pensar que los antioxidantes contenidos en las bebidas tienen una potencial capacidad protectora frente a la oxidación en órganos grasos. Este efecto se

ve fomentado en situaciones de moderado estrés oxidativo y a nivel de tejido hepático se revierte en presencia de etanol.

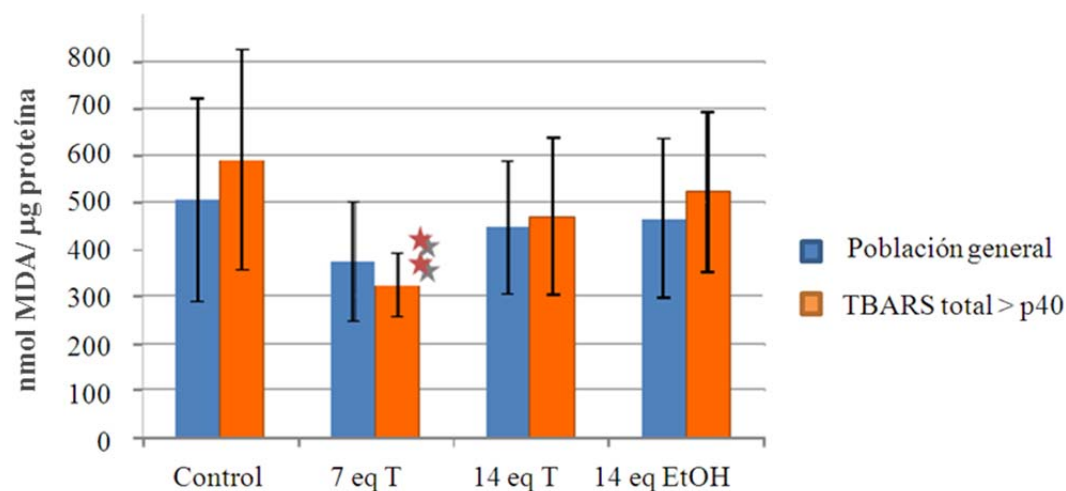


Figura 4.73. Peroxidación lipídica en tejido adiposo. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al grupo control *.

Vistos los resultados obtenidos en el estudio en animales, se puede concluir que las bebidas utilizadas tienen un potencial efecto protector frente al daño metabólico asociado a una dieta alta en colesterol y azúcares libres, mediante la disminución de los niveles de lipoproteínas LDL e índice LDL/HDL, junto con menores niveles de peroxidación lipídica en riñón, mayor síntesis de NO y una mayor expresión génica de la enzima iNOS en aorta. Asimismo, a tenor de los resultados obtenidos en las distintas subpoblaciones (glucosa, colesterol y TBARS > P₄₀), los beneficios de los productos analizados pueden ser potencialmente mayores en situaciones de estrés fisiológico. Estos resultados fueron en gran medida dosis dependientes, encontrándose un mayor efecto protector cardiovascular en la bebida dotada con una mayor capacidad antioxidante (14 eq T). Por otro lado, la adición de etanol a la bebida anuló estos efectos beneficiosos no observándose, en ese caso, ningún efecto respecto al control.

4.2.4. Estudio clínico

4.2.4.1. Estudio de toxicidad

Aunque habitualmente el ensayo clínico se realiza con el mismo producto estudiado previamente en un modelo animal, en este trabajo se decidió utilizar una bebida caracterizada por una mayor actividad antioxidante. En este sentido, se decidió llevar a cabo dicho estudio con el extracto obtenido a partir de uva Merlot que poseía el mayor valor TEAC. Así como paso previo al estudio clínico, se realizó el estudio de toxicidad en animales con el extracto MT3.

4.2.4.1 Mortalidad y signos clínicos

No se mostraron signos clínicos ni evidencias de mortalidad durante todo el período de observación.

4.2.4.2 Peso corporal

Los animales mostraron la curva de peso corporal esperado para esta cepa y sexo de acuerdo con la información proporcionada por el proveedor (Harlan Interfauna Ibérica, 2010).

El peso corporal y el aumento de peso corporal quedan reflejadas en las Tablas 4.12 y 4.13, respectivamente y en la Figura 4.74.

Tabla 4.12: Peso corporal de las ratas durante el período de observación.

| ID Animal | Peso corporal (g) | | |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | Estudio día 1 | Estudio día 8 | Estudio día 15 |
| 1 | 203,1 | 224,1 | 256,8 |
| 2 | 202,8 | 237,0 | 258,6 |
| 3 | 208,7 | 236,3 | 275,5 |
| 4 | 207,2 | 222,0 | 251,6 |
| 5 | 209,9 | 230,5 | 264,1 |
| Media \pm SD | 206,3 \pm 3,2 | 230,0 \pm 6,9 | 261,3 \pm 9,1 |

Tabla 4.13: Aumento del peso corporal de las ratas durante el período de observación.

| ID Animal | Aumento del peso corporal (g) | | |
|----------------|---------------------------------------|--|--|
| | Estudio desde el día 1 hasta el día 8 | Estudio desde el día 8 hasta el día 15 | Estudio desde el día 1 hasta el día 15 |
| 1 | 21 | 32,7 | 53,7 |
| 2 | 34,2 | 21,6 | 55,8 |
| 3 | 27,6 | 39,2 | 66,8 |
| 4 | 14,8 | 29,6 | 44,4 |
| 5 | 20,6 | 33,6 | 54,2 |
| Media \pm SD | 23,6 \pm 7,4 | 31,3 \pm 6,5 | 55,0 \pm 8,0 |

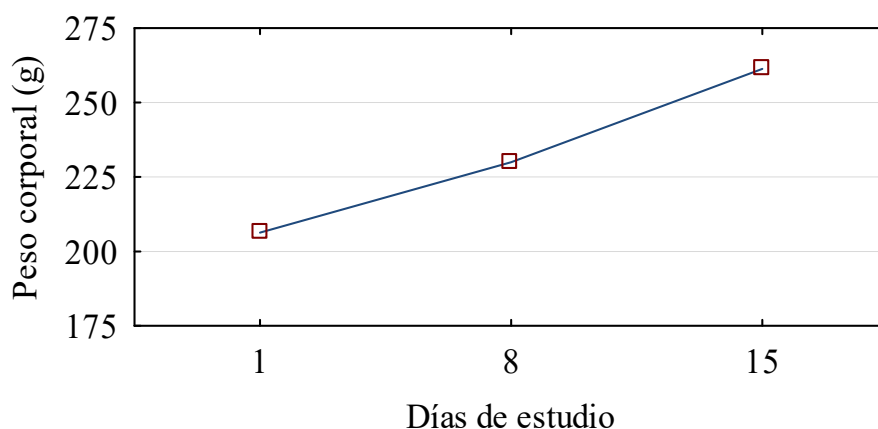


Figura 4.74. Peso corporal de las ratas durante el período de observación.

4.2.4.3 Evaluación y necropsia macroscópica.

No se encontraron anomalías durante la evaluación y necropsia macroscópica de órganos y tejidos.

Por tanto, en vista de los resultados obtenidos en este ensayo de toxicidad en animales, se puede concluir que el consumo de este extracto no presenta ningún riesgo para la salud humana.

4.2.4.4. Estudio clínico

Una vez comprobada la inocuidad del extracto MT3, se llevó a cabo el ensayo clínico, tal y como se ha detallado en el apartado de Materiales y Métodos. Se utilizó un ensayo clínico prospectivo aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo de 6 semanas de duración (2 fases de intervención de 2 semanas cada una, más 1 semana de lavado previa a cada intervención). En este estudio se utilizaron dos productos: una bebida funcional elaborada a partir del extracto MT3 (BF) y una bebida placebo (BP). Las características de estas dos bebidas se encuentran descritas en el apartado 3.5.1 de la sección de Materiales y Métodos. Asimismo, se establecieron dos grupos de intervención (A/B y B/A) con dos fases experimentales de 14 días de duración, y con un periodo de lavado previo, cada uno de ellos, de 7 días.

De las 31 personas seleccionadas que aceptaron participar en el estudio, 18 fueron aleatorizados en el grupo de tratamiento A/B y 13 en el grupo B/A. Al inicio del estudio los 31 sujetos que participaron presentaron características dietéticas antropométricas y de actividad física similar y la aleatorización por sexos fue adecuada (Tabla 4.14). Por lo tanto, la aleatorización de la población en los 2 grupos de tratamiento permitió obtener 2 grupos de intervención homogéneos.

Una vez aleatorizada la muestra se llevó a cabo la intervención dietética en función del tratamiento asignado y se evaluaron diferentes parámetros en función de los objetivos del estudio.

A continuación se desglosan los resultados obtenidos tanto en el estudio postprandial (Fase Aguda) como en el estudio de intervención a corto plazo.

Tabla 4.14. Características basales de la muestra en función del grupo de aleatorización.

| | Grupo A/B (n = 18) | Grupo B/A (n = 13) | p |
|------------------------------|--------------------|--------------------|----|
| Sexo | | | |
| Varones (%) | 44,4 | 53,8 | NS |
| Mujeres (%) | 55,6 | 46,2 | NS |
| Dieta | | | |
| Energía (kcal/día) | 1556,44 ± 380,17 * | 2131,45 ± 606,93 | NS |
| Hidratos de carbono (% kcal) | 42,92 ± 6,39 | 42,49 ± 7,25 | NS |
| Proteínas (% kcal) | 19,64 ± 2,71 | 17,71 ± 2,12 | NS |
| Grasa (% kcal) | 34,66 ± 5,96 | 37,07 ± 7,03 | NS |
| AGS (% kcal) | 11,24 ± 2,94 | 12,25 ± 3,19 | NS |
| AGM (% kcal) | 15,92 ± 3,31 | 16,78 ± 3,72 | NS |
| AGP (% kcal) | 4,28 ± 1,01 | 4,72 ± 1,26 | NS |
| Colesterol (mg/día) | 114,31 ± 317,17 | 397,91 ± 119,88 | NS |
| Fibra vegetal (mg/día) | 15,13 ± 5,80 | 17,15 ± 6,19 | NS |
| Actividad física | | | |
| Baja (% personas) | 0 | 7,7 | NS |
| Moderada (% personas) | 50 | 30,8 | NS |
| Alta (% personas) | 50 | 61,5 | NS |
| Antropometría | | | |
| Peso (kg) | 76,15 ± 15,87 | 72,83 ± 20,31 | NS |
| IMC (kg/m ²) | 26,56 ± 3,73 | 24,89 ± 5,05 | NS |

* Media ± S.D. Diferencias entre grupos $p \leq 0,05$, NS no significativo.

Tabla 4.15. Incidencias registradas respecto al nº de pacientes del estudio.

| | |
|--|------------------|
| Nº de pacientes que | |
| han sido incluidos | 31 (15 h y 16 m) |
| han finalizado el estudio | 26 |
| han sido excluidos antes de la finalización | 5 |
| - por Acontecimientos Adversos Graves | 0 |
| - por Desviación de Protocolo (no acuden a revisiones) | 2 (2 h) |
| - por no Tolerar el producto (dolor abdominal, sabor, vómito...) | 3 (3 m) |
| siendo candidatos elegibles no aceptaron participar | 6 (6 m) |
| se encuentran en activo | 0 |

4.2.4.5. Capacidad antioxidante del plasma

Estudio postprandial (Fase Aguda)

En la Figura 4.75 se reflejan los resultados obtenidos en la capacidad antioxidante del plasma, correspondiente al estudio postprandial (Fase Aguda).

Tras consumir un desayuno con alta carga calórica procedente de grasa saturada y azúcares sencillos, acompañado con una bebida placebo (Tto A) o con una BF derivada de la uva (Tto B), se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante del plasma en todos los tiempos posteriores al consumo del desayuno completo (Tpo 0 min) en el grupo de Tto B (BF) con respecto al grupo de Tto A (placebo) ($p \leq 0,05$):

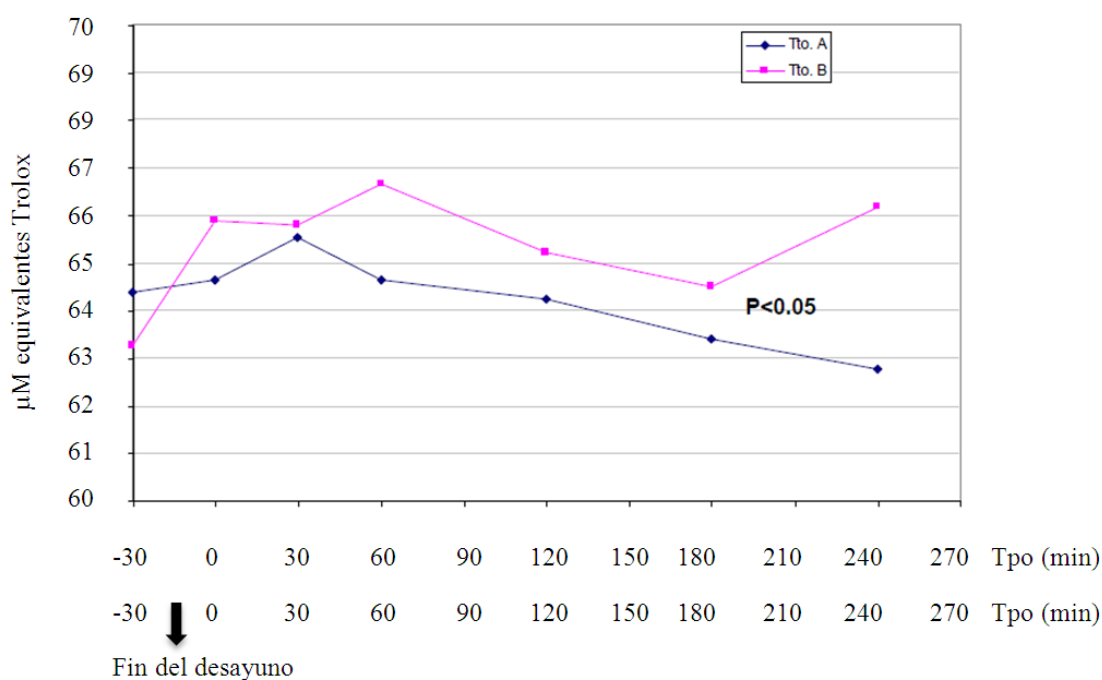


Figura 4.75. Evolución postprandial de la capacidad antioxidante (Valor TEAC) del plasma

Estudio de intervención a corto plazo (14 días)

Por otro lado, tras 14 días de intervención (estudio de intervención a corto plazo) consumiendo 2 veces al día el tratamiento asignado A o B, se ha observado que con el Tto B (BF) se produjo un aumento de la capacidad antioxidante del plasma con respecto al Tto A (placebo) ($p < 0,05$) (Figura 4.76).



Figura 4.76. Evolución de la capacidad antioxidante del plasma tras 15 días de intervención.

4.2.4.6. Otros parámetros indicadores de estrés oxidativo

En la medida de otros parámetros indicadores de estrés oxidativo, como vitamina E, urato y creatinina, no se observaron diferencias significativas en función del tratamiento ni en el estudio agudo ni tampoco en el estudio a largo plazo (Tabla 4.16).

Tabla 4.16 Valores de algunos parámetros indicadores de oxidación al inicio y al final de la intervención en función del producto consumido (μg/mL).

| Parámetros | A (BP) | | B (BF) | | p |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----|
| | Inicio | Fin | Inicio | Fin | |
| Vitamina E | 11,55 ± 2,68 | 10,62 ± 2,71 | 10,70 ± 2,91 | 10,02 ± 2,91 | NS |
| Urato | 7,58 ± 9,47 | 5,23 ± 1,27 | 5,26 ± 1,27 | 5,20 ± 1,12 | NS |
| Creatinina | 1,01 ± 0,01 | 1,00 ± 0,01 | 1,03 ± 0,01 | 1,03 ± 0,01 | NS |

Diferencias entre las variaciones de cada grupo de intervención ($p \leq 0,05$). NS, no significativo

4.2.4.7. Perfil lipídico (Col-t, LDL, HDL, TG)

Estudio postprandial (Fase Aguda)

Tras el estudio postprandial consumiendo un desayuno rico en grasa y azúcar acompañado de la bebida asignada (BF o BP) no se observó ninguna diferencia significativa en cuanto a los diferentes parámetros del metabolismo lipídico estudiados (Col-T, LDL, HDL, TG) (Figura 4.77, 4.78, 4.79 y 4.80).

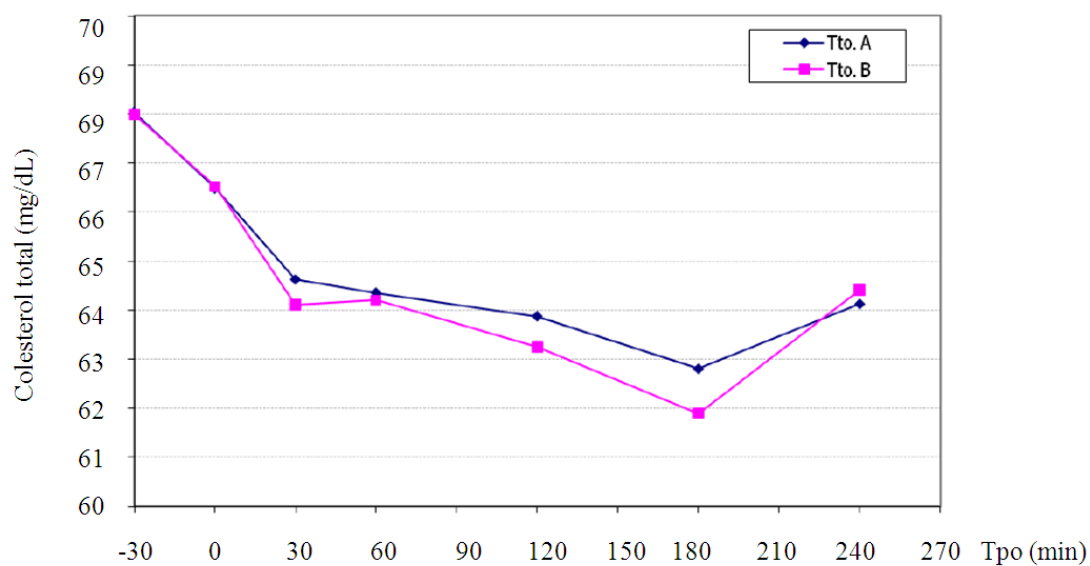


Figura 4.77. Evolución postprandial de los valores de Colesterol total (mg/dL) en función del producto asignado.

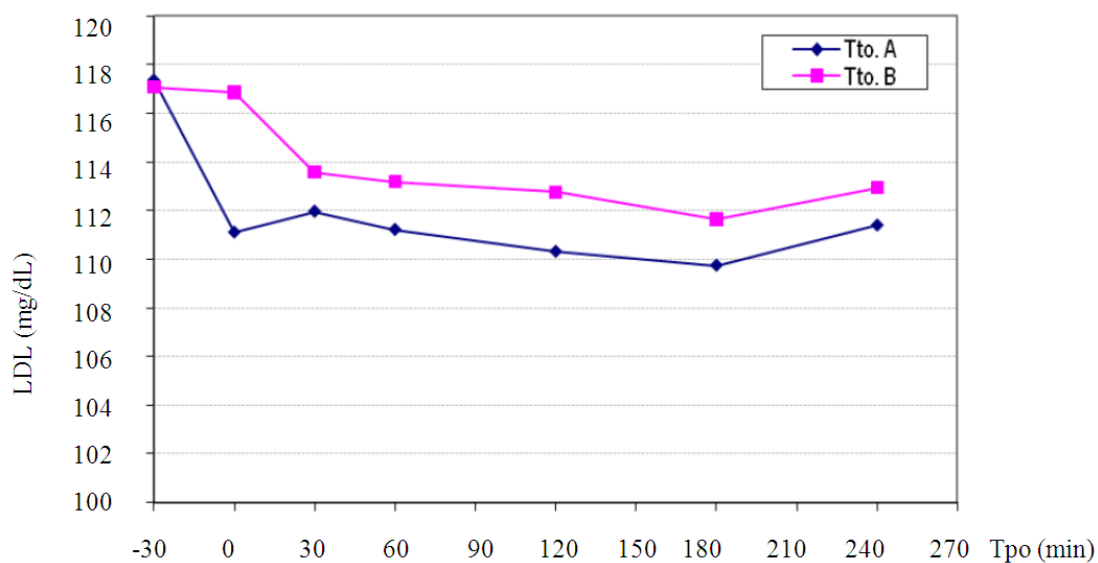


Figura 4.78. Evolución postprandial de los valores de LDL (mg/dL) en función del producto asignado.

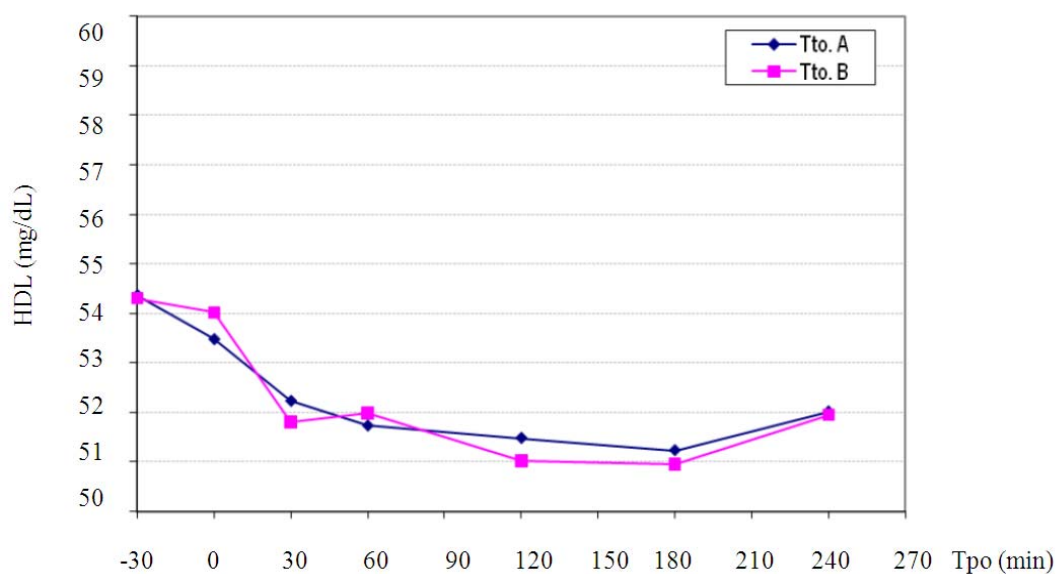


Figura 4.79. Evolución postprandial de los valores de HDL (mg/dL) en función del producto asignado.

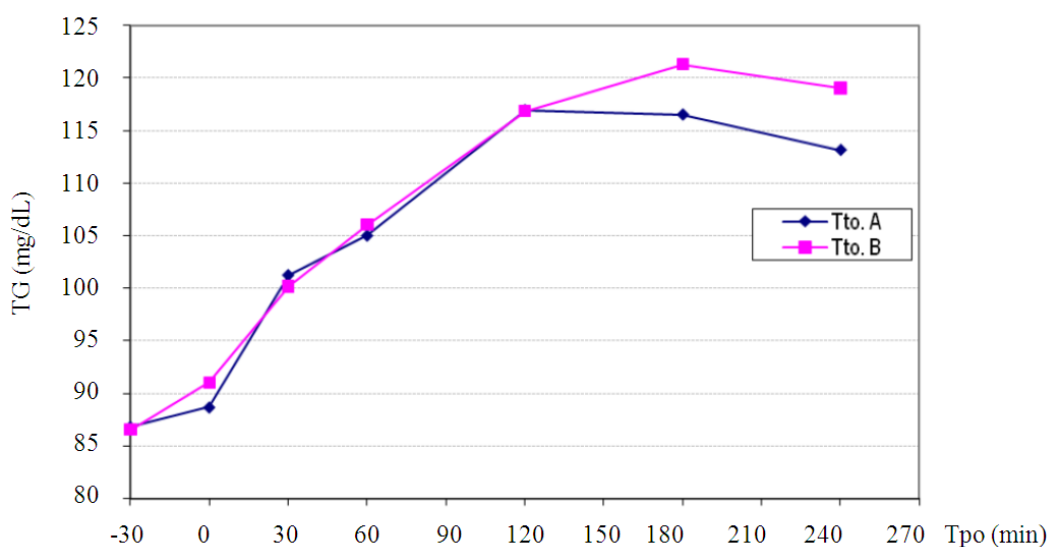


Figura 4.80. Evolución postprandial de los valores de TG (mg/dL) en función del producto asignado.

Estudio de intervención a corto plazo (14 días)

Asimismo, tras los 14 días de intervención consumiendo el producto asignado 2 veces al día, tampoco se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados en relación al metabolismo lipídico (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Valores de parámetros relacionados con el metabolismo lipídico al inicio y al final de la intervención en función del producto consumido.

| Parámetros | A (BP) | | B (BF) | | p |
|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----|
| | Inicio | Fin | Inicio | Fin | |
| Col-t (mg/dL) | 190,39 ± 31,61 | 183,48 ± 35,53 | 178,35 ± 33,35 | 10,02 ± 2,91 | NS |
| LDL (mg/dL) | 121,75 ± 27,24 | 115,07 ± 25,29 | 109,81 ± 1,27 | 5,20 ± 1,12 | NS |
| HDL (mg/dL) | 54,75 ± 15,36 | 54,70 ± 17,38 | 54,29 ± 0,01 | 1,03 ± 0,01 | NS |
| TG (mg/dL) | 87,10 ± 54,70 | 94,26 ± 65,31 | 85,16 ± 50,77 | 115,39 ± 112,62 | NS |

Diferencias entre las variaciones de cada grupo de intervención ($p \leq 0,05$). NS, no significativo

4.2.4.4. Parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa: Glucosa, insulina, índice HOMA

Estudio postprandial (Fase Aguda)

En cuanto a los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa que se estudiaron, se observó que cuando los sujetos consumieron la BF junto con el desayuno presentaron un aumento tanto de la glucosa, como de la insulina, como del índice HOMA, el cual es indicador de resistencia a insulina a los 30 min con respecto al consumo del desayuno con el producto placebo, siendo esta diferencia significativa sólo para la glucosa (Figura 4.81, 4.82 y 4.83). El Índice HOMA fue calculado utilizando la fórmula de Matthews (Matthews y col., 2004): $\text{HOMA-IR} = (\text{Glucosa basal (mg/dL)}/18) \times \text{insulina basal (mUI/mL)}/22,5$.

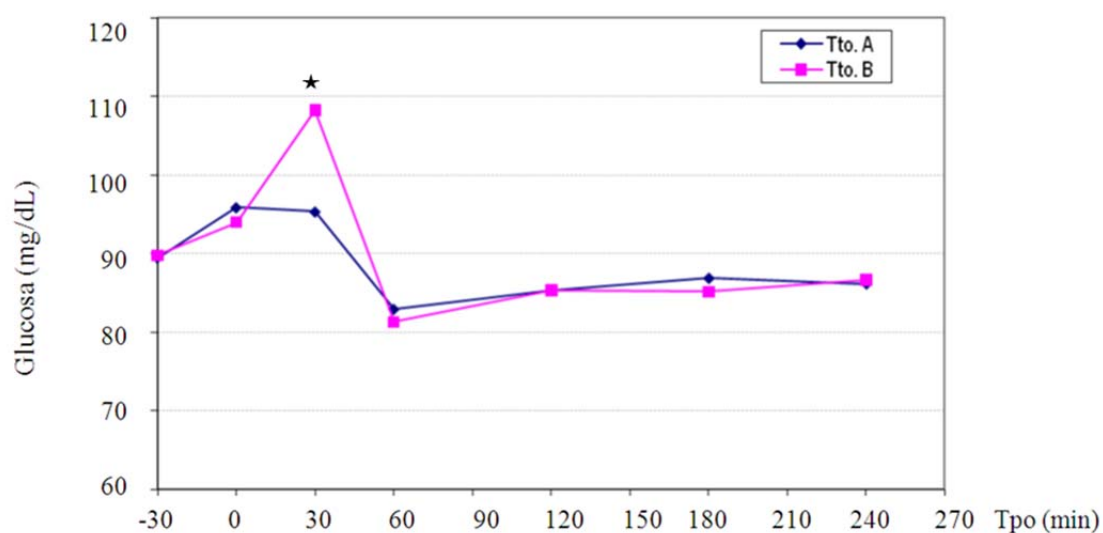


Figura 4.81. Evolución postprandial de los valores de glucosa (mg/dL) en función del producto asignado ($p \leq 0,05$).

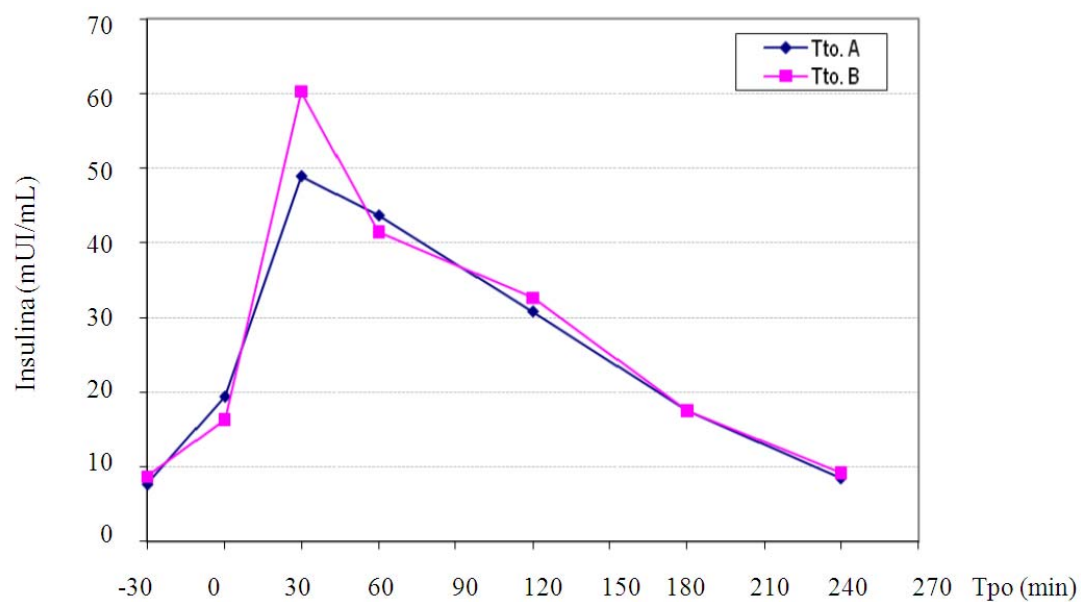


Figura 4.82. Evolución postprandial de los valores de Insulina (mUI/mL) en función del producto asignado.

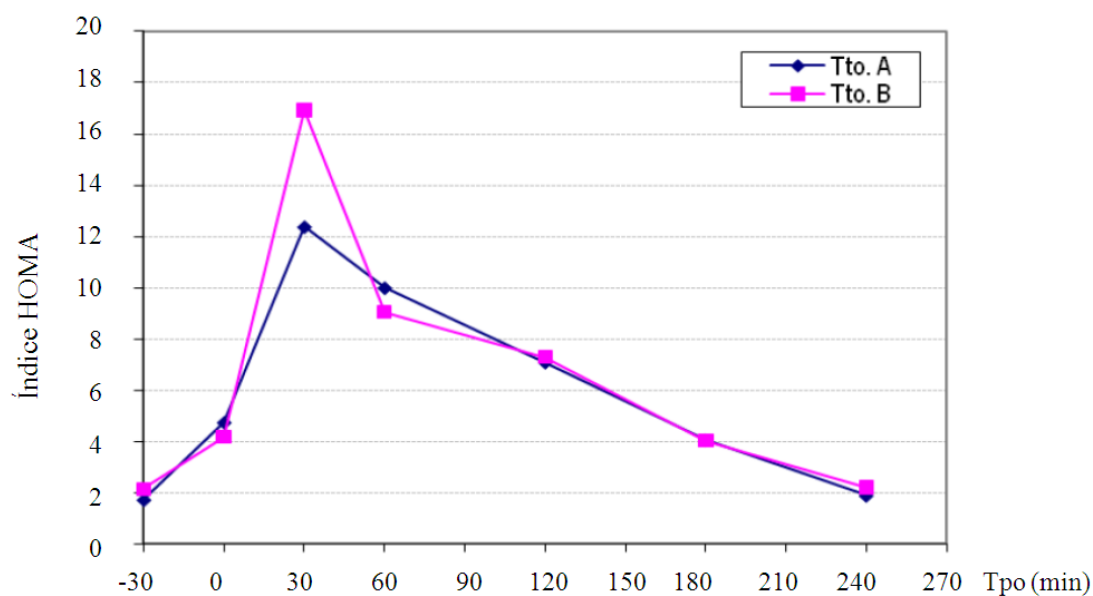


Figura 4.83. Evolución postprandial de los valores de Índice de HOMA en función del producto asignado.

Estudio de intervención a corto plazo (14 días)

Por otro lado, tras los 14 días de intervención consumiendo el producto asignado 2 veces al día, no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados en relación al metabolismo de la glucosa (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Valores de parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa al inicio y final de la intervención en función del producto.

| Parámetros | A (BP) | | B (BF) | | p |
|-------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|----|
| | Inicio | Fin | Inicio | Fin | |
| Gluc (mg/dL) | 89,32 ± 8,25 | 93,00 ± 89,61 | 89,23 ± 86,09 | 92,77 ± 8,77 | NS |
| Insulina (mUI/mL) | 7,96 ± 7,90 | 8,07 ± 7,07 | 7,93 ± 6,17 | 9,32 ± 8,60 | NS |
| HOMA | 1,67 ± 2,08 | 1,76 ± 1,92 | 1,72 ± 1,51 | 2,06 ± 2,23 | NS |

Diferencias entre las variaciones de cada grupo de intervención ($p \leq 0,05$). NS, no significativo

4.2.4.5. Marcadores de inflamación: Fibrinógeno y PCR.

En cuanto a los parámetros indicadores de inflamación estudiados, tampoco se observaron cambios significativos a lo largo de la intervención (Tabla 4.19).

Tabla 4.19. Valores de parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa al inicio y final de la intervención en función del producto.

| Parámetros | A (BP) | | B (BF) | | p |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----|
| | Inicio | Fin | Inicio | Fin | |
| Fibrinógeno (mg/dL) | 357,28 ± 62,39 | 359,96 ± 76,06 | 343,03 ± 62,80 | 352,71 ± 62,20 | NS |
| PCR | 1,67 ± 1,77 | 1,56 ± 1,39 | 1,76 ± 2,86 | 1,23 ± 1,03 | NS |

Diferencias entre las variaciones de cada grupo de intervención ($p \leq 0,05$). NS, no significativo

Los resultados analizados ponen de manifiesto que el consumo de Producto B (BF) podría estar relacionado con un efecto antioxidante, ya que el marcador principal objeto de este estudio (capacidad antioxidante del plasma) ha mostrado un aumento significativo a nivel postprandial, y tras los 14 días de intervención. Este hecho podría beneficiar a la población a largo plazo, ayudando a prevenir la oxidación de la LDL y por tanto ayudando a prevenir la formación de la placa de ateroma (lesiones en la capa íntima de una arteria) y en consecuencia el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular (ECV).

Diferentes investigaciones que comparan el consumo de bebidas ricas en compuestos fenólicos frente a placebos, han observado que estos productos pueden ejercer un papel beneficioso en la prevención de la ECV modulando el perfil lipídico por reducción de los TG, o el colesterol LDL (Castilla y col., 2006). Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado dichos resultados. Muchos de los estudios realizados se han llevado a cabo en intervenciones de mayor duración a la nuestra por lo que sería necesario llevar a cabo un ensayo clínico de larga duración (> 4 semanas) para poder estudiar en profundidad la posible influencia de estos productos en la regulación del metabolismo lipídico.

En cuanto a la regulación del metabolismo de la glucosa, algunos estudios sugieren que los compuestos fenólicos podrían regular beneficiosamente el

metabolismo de la glucosa, reduciendo el incremento brusco postprandial de la misma y por tanto mejorando el control hormonal de la insulina. Sin embargo, en el presente estudio hemos observado que consumiendo la BF junto con un desayuno rico en grasa y azúcares se produce un aumento significativo con respecto a la bebida placebo. Además, algunos autores sugieren que es necesario llevar a cabo más estudios para clarificar esta información ya que los datos obtenidos en diferentes estudios no llegan a ser concluyentes (Almoosawi y col., 2010).

5. CONCLUSIONES

1. Las variedades Roussanne, Riesling, Gewürstraminer, Viognier y Albariño presentan las características más interesantes de cara a la formulación de una bebida o vino con alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes a partir de uva blanca. En este sentido, dichas variedades presentan incluso mejores características que muchas de las variedades de uva tinta estudiadas.
2. Las variedades Alicante bouchet, Petit verdot, Variedades ancestrales 30, 32 y 8 junto con Merlot constituyen las variedades de uva tinta más interesantes de cara a la formulación de bebidas o vinos con alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes. En este sentido, la recuperación de variedades de uva ancestrales puede suponer una importante estrategia de cara a la obtención de bebidas con una alta capacidad antioxidante.
3. En general, el proceso de maceración de las uvas en presencia de un 12% de etanol dio lugar a un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, aunque dicho aumento se vio claramente influenciado por las características de la variedad de uva utilizada y por las características del compuesto fenólico analizado.
4. En el estudio de correlación llevado a cabo entre la actividad antioxidante de los extractos de uva y el IPT se observó un alto nivel de correlación. De esta manera, el empleo de una medida tan sencilla como el IPT podría ser utilizada como base para la discriminación de muestras dentro de un mismo estudio, aunque no constituya una medida directa de la actividad antioxidante de una determinada muestra.
5. Respecto a la influencia que las distintas familias de compuestos fenólicos ejercen sobre la actividad antioxidante de los extractos de uva blanca estudiados, los flavanoles y flavonoles son los que ejercen una mayor influencia. En el caso de los extractos de uva tinta, los flavanoles, junto con los ácidos hidroxibenzóicos son las familias que guardan una mayor relación con la actividad antioxidante. Sin embargo, se necesitarían nuevos estudios (con un mayor número de variedades y un análisis fenólico más exhaustivo) para confirmar dicha influencia.
6. Los extractos obtenidos a partir de hollejo de uva presentan una destacada actividad antioxidante, antiinflamatoria, así como una alta biodisponibilidad lo que los hace interesantes para la formulación de bebidas con efecto cardioprotector.

7. Respecto al estudio en animales, las bebidas utilizadas muestran un potencial efecto protector cardiovascular frente al daño metabólico asociado a una dieta alta en colesterol y azúcares libres. Asimismo, los beneficios de los productos analizados pueden ser potencialmente mayores en situaciones de estrés fisiológico.
8. Por último, en relación con el estudio clínico, la bebida empleada muestra un posible efecto beneficioso cardiovascular a largo plazo, debido al aumento en la capacidad antioxidante plasmática que produce. Sin embargo, para corroborar dicha hipótesis sería necesario un estudio de intervención de mayor duración.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J. D. y Culotta, V. C. (2012). Battles with Iron: Manganese in Oxidative Stress Protection. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(17);13541-13548.
- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, M. C., Martínex-Carballo, E., y Simal-Gándara, J. (2009). Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*. 113;53-60.
- Alfaras, I, Juan, M. E, Colome, H, y Planas, J. M. (2011). The bioavailability and distribution of *trans*-resveratrol are constrained by ABC transporters. 5th International Conference on Polyphenols and Health.
- Allen-Hall, L., Cano, P., Arnason, J. T., Rojas, R., Lock, O., y Lafreine, R. M. (2007). Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1b and TNF-a. *Journal of Ethnopharmacology*. 109;312-317.
- Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., y Al-Dujaili, E. (2010). The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition*. 103(6);842-850.
- Alonso Borbalán, A. M, Zorro, L, Guillén D.A., y Barroso C.G. (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*. 1012;31-38.
- Alonso, A. M., Domínguez, C., Guillén, D. A., y Barroso, C. G. (2002). Determination of Antioxidant Power of Red and White Wines by a New Electrochemical Method and Its Correlation with Polyphenolic Content. *Journal Agr Food Chem*. 50;3112-3115.
- Álvarez, E. y Orallo, F. (2004). Los flavonoides (I): biodisponibilidad, acción antiinflamatoria e inmunorreguladora. *El Farmacéutico*. 313;60-69.
- Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., y Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*. 563;109-115.
- Amrani, K. y Glories, Y. (1995). Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue française d'oenologie*. 35(153);28-31.
- Anastasiadi, M, Pratsinis, H, Kletsas, D, Skaltsounis A.L, y Haroutounian S.A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*. 43;805-813.

- Andriambeloson, E., Kleshyov, A. L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J. C., y Andriantsitohaina, R. (1997). Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 120;1053-1058.
- Andriambeloson, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., Stoclet, J. C., y Andriantsitohaina, R. (1998). Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *JN The Journal of Nutrition*. 128;2324-2333.
- Andriantsitohaina, R., Andriambeloson, E., y Stoclet, J. C. (1999). Pharmacological approaches of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by polyphenols from plant extracts. *Methods in Enzymology*. 301;522-532.
- Arbenz, A. y Avérous, L. (2015). Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. *Green Chemistry*. 17;2626-2646.
- Arcari, S. G., Chaves, E. S., Vanderlinde, R., Rosier, J. P., y Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. *Food Research International*. 53;164-173.
- Arnous, A. y Meyer, A. S. (2009). Grape skins (*Vitis vinifera* L.) catalyse the in vitro enzymatic hydroxylation of *p*-coumaric acid to caffeic acid. *Biotechnology Letters*. 31(12);1953-1960.
- Aron, Patricia. M y Kennedy, James. A. (2007). Compositional Investigation of Phenolic Polymers Isolated from *Vitis vivifera* L. Cv. Pinot during Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55;5670-5680.
- Arribas, A. S., Martínez-Fernández, M., Moreno, M., Bermejo, E., Zapardiel, A., y Chicharro, M. (2013). Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. *Food Chemistry*. 136(3-4);1183-1192.
- Bais, A. J., Murphy, P. J., y Dry, I. B. (2000). The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27;723-723.
- Bavaresco, L. y Fregoni, C. (2001). Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Roubelakis-Angelakis, K.A.
- Becatti, E., Chkaiban, L., Tonutti, P., Forcato, C., Bonghi, C., y Ranieri, A. M. (2010). Short-Term Postharvest Carbon Dioxide Treatments Induce Selective Molecular and Metabolic Changes in Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*. 58;8012-8020.

- Becker, B. F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 14(6);615-631.
- Belitz, H. D., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. 4rt, vol .Berlin Heidelberg. Springer-Verlag.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1;233-240.
- Bereswill, S. (2010). Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation.
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., y Lamuela-Raventos, R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by high-performance liquid cromatography: changes during vinification. *J Agric Food Chem.* 44;3040-3046.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* 28;25-30.
- Bravo, L. y Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture.* 49(2);135-141.
- Buendía, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., López, J. M., y Tomás-Barberán, F. A. (2010). HPLC-MS Analysis of proanthocyanidin oligomers an other phenolic in 15 strawberry cultivars. *Journal Agr Food Chem.* 58(7);3916-3926.
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., y Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular andmetabolic diseases. *Journal of Translational Medicine.* 12;210-219.
- Burton, G. W., Foster, D. O., Perly, B., Slater, T. F., Smith, I. C. P., y Ingold, K. U. (1985). Biological antioxidants. *Philosophical Transactions The Royal Society B.* 311;565-578.
- Burton, G. W., Wronska, U., Stone, L., Foster, D. O., y Ingold, K. U. (1990). Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea-pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E.Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E *in vivo*. *Lipids.* 25;199-210.
- Cáceres-Mella, A., Flores-Valdivia, D., Laurie, V. F, López-Solis, R., y Peña-Neira, A. (2014). Chemical and Sensory Effects of Storing Sauvignon Blanc Wine in Colored Bottles under Artificial Light. *Journal agricultural and food chemistry.* 62;7255-7262.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors.* 6(4);391-397.

- Cadot, Y, Miñana-Castelló, M. T, y Chevalier, M. (2006). Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54;9206-9215.
- Canals, R, LLaudy, M. C, Valls, J, Canals, J. M, y Zamora, F. (2005). Influence of Ethanol Concentration on the Extration of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53;4019-4025.
- Cantos, E., Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new "functional" fruit? *J Agric Food Chem*. 49(10);5052-5058.
- Cantos, E., Espin J.C., y Tomás-Barberán, F. A. (2002a). Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50;5691-5696.
- Cantos, E., Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A. (2002b). Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *J Agric Food Chem*. 50(22);6322-6329.
- Cantos, E., Espin J.C., Fernández, M. J., Oliva, J., y Tomas-Barberan, F. A. (2003). Postharvest UV-C-Irradiated Grapes as a Potential Source for Producing Stilbene-Enriched Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51;1208-1214.
- Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M., y Thomas, M. R. (2008). A molecular genetic prespective of reproductive development in grapevine. *Journal of experimental botany*. 59;2579-2596.
- Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, JL., Fernández Lucas, M., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., y Lasunción, M. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *American Society for Clinical Nutrition*. 84(1);252-262.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., y Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55;992-1002.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., y Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23;699-705.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Marini, F., Samperi, R., Antonacci, D., y Laganà, A. (2010). The interactive effects of irrigation, nitrogen fertilisation rate, delayed harvest and storage on the polyphenol content in red grape

- (*Vitis vinifera*) berries: A factorial experimental design. Food Chemistry. 122;1176-1184.
- Cerdá, B., Tomás-Barberán, F. A., y Espín, J. C. (2004). Metabolism of chemopreventive and antioxidant ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts and oak-aged wines in humans: Identification of biomarkers and individual variability. J Agric Food Chem.
- Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Mínguez, S., Jiménez-Jorquera, C., y del Valle, M. (2012). Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue. Analytica Chimica Acta. 732;172-179.
- Chaher, N., Arraki, K., Dillinseger, E., Temsamani, H., Bernillon, S., Pedrot, E., Delaunay, J. C., Mérillon, J. M., Monti, J. P., Izard, J. C., Atmani, D., y Richard, T. (2014). Bioactive stilbenes from *Vitis vinifera* grapevine shoots extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture. 94(5);951-954.
- Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., y Douillard, R. (2003). Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. Journal Agr Food Chem. 51;3179-3184.
- Chen, G. L., Hu, K., Zhong, N. J., Guo, J., Gong, Y. S., Deng, X. T., Huang, Y. S., Chu, D. K., y Gao, Y. Q. (2013). Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an in vitro digestion model. European Food Research and Technology. 236;303-310.
- Chiva-Blanch, G., Urpí-Sardá, M., Llorach, R., Rotches-Ribalta, M., Guillén, M., Casas, R., Arraz, S., Valderas-Martínez, P., Portoles, O., Corella, D., Tinahones, F., Lamuela-Raventós, R. M., Andres-Lacueva, C., y Estruch, R. (2012). Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. American Journal of Clinical Nutrition. 95(2);326-334.
- Chu, H., Tang, Q., Huang, H., Hao, W., y Wei, X. (2016). Grape-seed proanthocyanidins inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPK and NF- κ B signal pathways. Environmental Toxicology and Pharmacology. 41;159-166.
- Cliff, M., King, M. C., y Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. Food Research International. 40;92-100.
- Codex Alimentarius (2013). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es>.

- Crespy, V, Morand, C., Besson, C, Manach, C., Demigne, C., y Remesy, C. (2002). Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach. *Journal Agr Food Chem.* 50;618-621.
- Cueva, C, Mingo, S, Muñoz-González, I, Bustos, I, Requena, T, del Campo, R, Martín-Alvarez, P. J., Bartolomé, B., y Moreno-Arribas, M. V. (2011). Antibacterial activity of phenolic compounds and extracts against potential respiratory pathogens. 5th International Conference on Polyphenols and Health.
- Cuzzocrea, S. y Reiter, R. J. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 426;1-10.
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M. D., P.Henriques, J. A., y Eleutherio, E. (2008). Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56;4268-4272.
- Daniel, O., Meier, M. S., Schlatter, J., y Frischknecht, P. (1999). Selected Phenolic Compounds in Cultivated Plants: Ecologic Functions, Health Implications, and Modulation by Pesticides. *Environ Health Perspect.* 107;109-114.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., y Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry.* 93;325-330.
- Day, A. J., Canada, F. J., Díaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchan, R., Faulds, C. B., y Plumb, G. W. Morgan M. R. Williamson G. (2000). Dietary flavanoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters.* 468;166-170.
- de Andrés de Prado, R., Yuste-Rojas, M, Sort, X., Andrés-Laueva, C., Torres, M., y Lamuela-Reventós R.M. (2007). Effect of soil type on wine produced from *Vitis vinifera* L cv. Grenache in comercial vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55;779-786.
- de Beer, D. (2002). The antioxidant activity of south african wines in different test systems as affected by cultivar and ageing. Thesis for degree of Master of Science in food science. University of Stellenbosch. Faculty of Agricultural and Forestry Sciences
- de Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., y Manley, M. (2002). Phenolic compounds: a review of their possible role as *In vivo* antioxidants of wine. *South Africa Journal of Enology and Viticulture.* 23(2);48-61.
- Delgado, S y Mayo, B. (2006). Identification of Dominant Bacteria in Feces and Colonic Mucosa from Healthy Spanish Adults by Culturing and by 16S rDNA Sequence Analysis. *Digestive Disease and Sciences.* (51);744-751.

- Deliargyris, E. N. y Newby, L. K. (2004). Focusing on inflammation in the treatment of atherosclerosis. *Cardiology in Review*. 12;194-200.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Gimmanco, S., La Neve, L., y Gimmanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*. 111;45-49.
- Diplock, A. T., Aggett, P. A., Ashwell, M., Bornet, F., Forn, E. B., y Robertfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*. 81(suppl);S1-S27.
- Diplock, A. T., Charleux, J. L, Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., y Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. 80(suppl 1);S77-S112.
- Dorai, T. y Aggarwal, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letter*. 215;129-140.
- Dragsted, L. O., Strube, M., y Larsen, J. C. (1993). Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Parmachol Toxicol*. 72;116-135.
- Dreosti, I. E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. 16(7-8);692-694.
- Drewnowski, A. yomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 72;1424-1435.
- Du Toit, W. J. y Visagie, M. (2012). Correlations between South African Red Grape and Wine Colour and Phenolic Composition: Comparing the Glories, Iland and Bovine Serum Albumin Tannin Precipitation Methods. *S Afr J Enol Vitic* . 33(1);33-41.
- Duarte Pérez, J. M. y Jiménez Meleón, R. (2011). Confirman que la ingesta de vino tinto reduce la presión sanguínea. *Granada ideal*.
- Dudonné, S. (2009). Comparative study of antioxidant propeties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays.
- Durrani, AI, Schwartz, H, Nagl, M, y Sontag, G. (2015). Determination of free [alpha]-lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chemistry*. 120(4);38329-38336
- Dwyer, J. (1996). Is there a need to change the American Diet? *Adv Exp Med Biol*. 401;189-198.
- EFSA. (2011). Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA Journal*. 9(12);2474-

- Erexson, G. L. (2003). Lack of *in vivo* clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology*. 41(3);347-350.
- Esterbauer, H., Wäg, G., y Puhl, H. (2014). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*. 49;566-576.
- Fang, F., Li, J. M., Pan, Q. H., y Huang, W. D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*. 101;428-433.
- Fernandez, K. y Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*. 139;196-202.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., y Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and meatonin: A review. *Food Chemistry*. 130;797-813.
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., García-Parrilla, M. C., y Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chem Acta*. 513;113-118.
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., y García-Parrilla, M. C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*. 563;101-108.
- Ferrazzano, G. F., Amato, A., Ingenito, A., De Natale, A., y Pollio, A. (2009). Anti-carcinogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*. 80;252-262.
- Fischer-Nielsen, A., Poulsen, H. E., y Loft, S. (1992). 8-hydroxydeoxyguanosine *in vitro*: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 13(2);121-126.
- Fitzpatrick, D. F., Hirschfield, S. L., y Coffey, R. G. (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology*. 265;H774-H778.
- Flanzy, C. (2003). La vinificación bordelesa de uvas tintas. Mundi-Prensa Libros. 2 Ed.;4;393-539.
- Fracasselti, D., Lawrence, N., Tredoux, A. G. J, Tirelli, A., Nieuwoudt, H. H., y Du Toit, W. J. (2011). Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*. 128(4);1136-1142.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., y Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 341;454-457.

- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric.* 80;1925-1941.
- Frei, B., England, L., y Ames, B. N. (1989). Ascorbate in an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86;6377-6381.
- Fuhrman, B., Volkova, N., Coleman, R., y Aviram, M. (2005). Grape Powder Polyphenols Attenuate Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E Deficient (E0) Mice and Reduce Macrophage Atherogenicity. *Journal of Nutrition.* 135;722-728.
- Galisteo Ochaíta, Juan. (2008). Actividad antioxidante y antinitrosante de compuestos indólicos y β -carbólinas presentes en alimentos. Instituto de fermentaciones industriales (C.S.I.C.)
- Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., y Revilla, E. (2003). Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51;5622-5629.
- García-Ruiz, A., Bartolome, B., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., y Moreno-Arribas, M. V. (2007). Nuevas perspectivas de la aplicación de los polifenoles como antimicrobianos en enología. *ACE Revista de Enología.*
- Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G., y Daglia, M. (1998). Anti-and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46;4118-4122.
- Gee, J. M., Dupont, M. S., Rhodes, M. J., y Johnson, I. T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med.* (25);19-25.
- Genova, G., Iacopini, P., Baldi, M., Raineri, A., Storchi, P., y Sebastiani, L. (2012). Temperature and storage effects on antioxidant activity of juice from red and white grapes. *International Journal of Food Science and Technology.* 47(1);13-23.
- Ghezzi, P. (2005). Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res.* 39(6);573-580.
- Goldberg, I. J., Mosca, L., Piano, M. R., y Fisher, E. A. (2001). A Science Advisory for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Cardiovascular Nursing of the American Heart Association. *AHA Science Advisory.* 103;472-475.
- Gomez-Juaristi, M, Gonzalez-Torres, L., Bravo, L., Vaquero, M. P., Bastida, S., y Sanchez-Muniz, F. J. (2011). Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria.* 26(2);289-292.

- Gómez-Miguel, V. D. y Sotés, V. (2014). El Manganeseo y la Viticultura: una revisión. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Gonthier, M. P., Cheynier, V., Donova, J. L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapiere, C., Remsey, C., y Scalbert, A. (2003). Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *Journal of Nutrition*. 133;461-647.
- Gonzalez, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suarez, M. D., Zarzuela, A., y Martinez-Agustin, O. (2011). Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51;331-362.
- Gonzalez-Barrio, R., Beltrán, D., Cantos, E., Gil, M. I., Espin J.C, y Tomás-Barberan, F. A. (2006). Comparison of Ozone and UV-C Treatments on the Postharvest Stilbenoid Monomer, Dimer, and Trimer Induction in Var. 'Superior' White Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54;4222-4228.
- González-SanJosé, M. L., Barron, L., y Díez, C. (1990). Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models. *Journal Science Food Agricultural*. 51;337-343.
- Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., y Kanner, J. (2008). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB Journal - Research Communication*. 22;41-46.
- Gorjanovic, S. Z., Novakovic, M. M., Potkonjak, N. I., y Suznjec, D. Z. (2010). Antioxidant Activity of Determined by a Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*. 58;4626-4631.
- Grisebach, H y Ebel, J. (1978). Phytoalexine, chemische Abwehrstoffe hoeherer Pflanzen? *Angew Chem*. 90;668-681.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P., y Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*. 89;1-9.
- Guerrero, R. F., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., y Cantos-Villar, E. (2009a). Wine, resveratrol and health: a review. *Natural Products Communication*. 4(5);635-658.
- Guerrero, R. F., Liazid, A., Palama, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, Á., García-Barroso, C., y Cantos-Villar, E. (2009b). Phenolic characterization of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*. 112;949-955.

- Gupta, R. K., Patel, A., hah, N., haudhary, K. A., a, U. K., dav, U. C., pta, P. K., y kuwal, U. (2014). Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*. 15;4405-4409.
- Hablemos claro (2017). El consumo moderado de vino y la salud. <http://www.hablemosclaro.org/carrusel/vino-salud.aspx..>
- Hahlbrock, K. y Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40;347-369.
- Halliwel, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. 52(8);253-265.
- Halliwel, B. (1995). How to characterize an antioxidant: An update. *Biochemical Society Symposia*. 61;73-101.
- Halliwel, B. (1999). Food-derived antioxidants. Evaluating their importance in food and *in vivo*. *Food Sci Agric Chem*. 1;67-109.
- Halliwel, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 35;1147-1150.
- Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bøhn, S. K., Holte, K., Jacobs, D. R., y Blomhoff, R. (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84;95-135.
- Harbertson, J. y Spayd, S. (2006). Measuring phenolics in the winery. *Am J Enol Vitic*. 57(3);280-288.
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in Plant Biochemistry*. vol. 1;
- Harlan Interfauna Ibérica. (2010). *Wistar Han™*. p.6;
- Hasler, C. M. (2000). The changing face of functional foods. *Journal American College Nutrition*. 19(5);499S-506S.
- Hayes, R. E., Bookwalter, G. N., y Bagley, E. B. (1977). Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review. *Journal of Food Science*. 42(6);1527-1532.
- He, S., Sun, C., y Pan, Y. (2008). Red Wine Polyphenols for Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067*. 9;842-853.
- Heldt, HW. (1997). *Pflanzenbiochemie*. 1. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Hennig, K. y Burkhardt, R. (1960). Detection of Phenolic Compounds and Hydroxy Acids in Grapes, Wines, and Similar Beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57;468-473.
- Henry-Vitarc, C, Desmouliere, A., Girard, D., Merillon, J. M., y Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *European Journal Nutrition*. 45;376-382.
- Horax R, Hettiarachchy N, y Chen P. (2010). Extration, Quantification, and Antioxidant Activities of Phenolics from Pericarp and Seeds of Bitter Melons (*Momordica charantia*) Harvested at Three Maturity Stages (Immature, Mature, and Ripe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*. 58;4428-4433.
- Horstman, J. A., Wrona, M. Z., y Dryhurst, G. (2002). Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. 30. (371);382-
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A, Zhang, L. L., Scherer, B., y Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425;191-196.
- Huang, H., Sun, Y., Lou, S., Li, H., y Ye, X. (2014). In vitro digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. *Food Chemistry*. 146;363-370.
- Hudson, B. J. F. y Lewis, J. I. (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*. 10(1);47-55.
- Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., y Waterhouse, A. L. (2002). Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 53(3);218-221.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., y Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21;589-598.
- Iriti, M. y Varoni, E. M. (2014). Melatonin: A New Perspective on the Mediterranean Diet. November 2014. 19;199-204.
- Jaeger, S. R., Axten, L. G., Wohlers, M. W., y Sun-Waterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages: insights from sensory and consumer science. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89;2356-2363.
- Jahan, M. S., Chowhurdy, D. A., y Islam, M. K. (2006). Characterization and evaluation of golpata fronds as pulping raw materials. *Bioresource Technology*. 97(2);401-406.
- Janisch, K. M, Olschlager, C, Treutter D, y Elstner, E. F. (2006). Simulated Digestion of *Vitis vinifera* Seed Powder: Polyphenolic Content and

- Antioxidant Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54;4839-4848.
- Jeandet, P., Bessis, R., y Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. Am J Enol Vitic. 42;41-46.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., y Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. Journal Agr Food Chem. 50;2731-2741.
- Jensen, J. S., Demirey, S., Egebo, M., y Minardi, M. (2008). Prediction of wine color attributes from the phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56;1105-1115.
- Jordao, A. M., DaSilva, J. M., y Laureano, O. (1998). Evolution of anthocyanins during grape maturartion of two varieties (*Vitis vinifera* L.). Vitis. 37(2);93-94.
- Juan, M. E, Vinardell, M. P., y Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. Journal of Nutrition. 132;257-260.
- Juan, M. E., Lamuela-Raventos, R. M., de la Torre-Boronat, M. C., y Planas, J. M. (1999). Determination of *trans*-resveratrol in plasma by HPLC. Anal Chem. 1(71);747-750.
- Kaperonis, E. A., Liapis, C. D., Kakisis, J. D., Dimitroulis, D., y Papavassiliou, V. G. (2006). Inflammation and atherosclerosis. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 31;386-393.
- Karvela, E., Makris, D. P., Kalogeropoulou, N., y Karathanosa, V. T. (2011). Deployment of response surface methodology to optimize recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem and seed polyphenols. Procedia Food Science. 1;1686-1693. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11).
- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I, y Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chemistry. 86(4);593-600.
- Katalinic, V., Mozina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., y Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry. 119;715-723.
- Kawahito, S., Kitahata, H., y Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. World Journal Gastroenterol. 15(33);4137-4142.

- Kennedy, James. A, Matthews, Mark. A, y Waterhouse, A. L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin wine flavonoids. *Am J Enol Vitic.* 53;268-274.
- Khanal, R, Howard, L, y Prior, R. (2009). Procyanidin Composition of Selected Fruits and Fruit Byproducts Is Affected by Extraction Method and Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article.* 57;8839-8843.
- Kim, H. Y., Kim, O. H., y Sung, M. K. (2003). Effects of Phenol-Depleted and Phenol-Rich Diets on Blood Markers of Oxidative Stress, and Urinary Excretion of Quercetin and Kaempferol in Healthy Volunteers. *Journal of the American College of Nutrition.* 22(3);217-223.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., y Kanner, J. (1993). Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology.* 47;85-89.
- Kocadagli, T, Yilmaz, C., y Gökmen, V. (2014). Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry.* 153;151-156.
- Kohen, R. y Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicology pathology.* 30(6);620-650.
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., y Ames, B. N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85;3175-3179.
- Koli R, Erlund I, Jula A, Marniemi J, Matitila P, y Alfthan G. (2010). Bioavailability of Various Polyphenols from a Diet Containing Moderate Amounts of Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article.* 58;3927-3932.
- Kondrashov, A., Sevcik, R., Benáková, H., Kostrítov, M., y Stipek, S. (2009). The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines. *e-Spen, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism.* 4;e41-e46.
- Kong, K. W., Mat-Junit, S., Ismail, A., Aminudi, N., y Abdul-Aziz, A. (2014). Polyphenols in *Barringtonia racemosa* and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin. *Food Chemistry.* 146;85-93.
- Kontush, A., Guérin, M., y Chapman, M. J. (2008). Spotlight on HDL-raising therapies: insights from the torcetrapib trials. *Nat Clin Pract Cardiovasc.* 5(6);329-336.
- Kostadinoviæ, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., y Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chemistry.* 135;3003-3009.

- Krinsky, N. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Research Communications*. 7;617-635.
- Kuc, J. (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol*. 33;275-297.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., y Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85;633-640.
- Kusuhara, H. y Sugiyama, Y. (2002). Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release*. 78(1-3);43-54.
- Labuschagne, C. F., Stigter, E. C, Hendriks, M. M., Berger, R., Rokach, J., Korswagen, H. C., y Brenlman, A. B. (2013). Quantification of in vivo oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* during aging by endogenous F3-isoprostane measurement. *Aging Cell*. 12(2);214-223.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., y Yang, C. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations¹⁻⁴. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81;284S-91S.
- Lambert, J. D., Sang, S., y Yang, C. S. (2007). Possible Controversy over Dietary polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem Res Toxicol*. 20583-585.
- Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Waterhouse, A. L., y de la Torre-Boronat, M. C. (1995). Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem*. 43(2);281-283.
- Landrault, N., Larronde, F., delaunay, J. C, Castagnino, C, Vercauteren, J, Merillon, J. M, Gasc, F, Cros, G., y Teissedre, P-L. (2002). Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50;2046-2052.
- Langcake, P y Pryce, RJ. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 9;77-86.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., y Teissedre, P-L. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French Wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49;3341-3348.
- Lapornik, B., Prošek, M., y Wondra, A. G. (2005). Comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraciton time. *Journal of Food Engineering*. 71;214-222.
- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., y Dolara, P. (2009a). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-

inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition and Food Research*. (53);1044-1054.

- Larrosa, M., Yáñez-Gascón, J., Selma, V., González-Sarriás, A., Cerón, J. J., Tomás-Barberán, F. A., Dolara, P., y Espín, J. C. (2009b). A low dose of dietary resveratrol exerts prebiotic effect, regulates gene expression, decrease inflammation markers, and protect tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J Agric Food Chem*. 57;2211-2220.
- Laufenberg, G., Kunz, B., y Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Biosource Technology*. 87167-198.
- Leighton, F. y Urquiaga, I. (2000). Polifenoles del Vino y Salud Humana. *Antioxidantes y Calidad de vida*. 7;5-13.
- Lerman, L., Textor, S., y Grande, J. (2009). Mechanisms of Tissue Injury in Renal Artery Stenosis: Ischemia and Beyond. *Symposium on Renovascular Disease*. 52(3);196-203.
- Lesschaeve, I. y Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81;330S-335S.
- Li, A.-N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., Chen, Y.-M., y Li, H.-B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*. 6;6020-6047.
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., y Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 46;76-82.
- Liu, R. H. y Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal agricultural and food chemistry*. 53(10);4311-4314.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., y Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal Neurochemistry*. 69(2);581-593.
- Llaudy, M. C., Canals, R., Cabanillas, P., Canals, J. M., y Zamora, F. (2005). La maceración prefermentativa en frío. Efectos en la extracción del color y los compuestos fenólicos, e influencia del nivel de maduración de la uva. *ACE Revista de Enología*.
- Llorach, R., Garrido, I., Monagas, M., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Bartolome, B., y Andrés-Lacueva, C. (2010). Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skin polyphenols. *Journal of Proteome research*. 9(11);5859-5867.

- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G. L., y Salinas, M. R. (2005). Effect of Red Grapes Co-winemaking in Polyphenols and Color of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53;7609-7616.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., y Yankner, B. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 429;883-889.
- Lucero, J., Vijayagopal, P., y Juma, S. (2014). Chondroprotective role of whole grape polyphenols in stimulated SW 1353 cells. *The FASEB Journal - Research Communication*. 28(1);S830.27-
- Maciel, M. E., Castro, G. D., y Castrol, J. A. (2004). Inhibition of the rat breast cytosolic bioactivation of ethanol to acetaldehyde by some plant polyphenols and folic acid. *Nutr Cancer*. 49;94-99.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., y Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613(1);1-19.
- Makris, D. P., Boskou, G., y Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20;125-132.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., y Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wine: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19;396-404.
- Manach, C., Morand, C., Teixeira, O., Favier, M. L., Agullo, G., Demigne, C., Regerat, F., y Remesy, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition*. 125;1911-1922.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., y Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5);727-747.
- Marinova, E. M. y Yanishlieva, N. V. (1994). Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *Journal of the American Oil Chemists Science*. 71(4);427-434.
- Martinez, N., Casós, K., Simonetti, P., Sáiz, M., Moreno, J. J., y Mitjavila, M. T. (2013). De-alcoholised white and red wines decrease inflammatory markers and NF- κ B in atheroma plaques in apoE-deficient mice. *European Journal of Nutrition*. 52;737-747.
- Martinez-Ortega, M. V., Garcia-Parrilla, M. C., y Troncoso, A. M. (2001). Changes in phenolic composition of wines submitted to *in vitro* dissolution test. *Food Chemistry*. 73;11-16.

- Martorell, P., Llopis, S., Gonzalez, N, Chenoll, E., Lopez-Carreras, N., Aleixandre, A., Chen, Y., Karoly, E. D., Ramón, D., y Genovés, S. (2016). Probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145 reduces fat content and codulates lipid metabolism and antioxidant response in *Caenorhabditis elegans*. *Journal agricultural and food chemistry*. 64(17);3462-3472.
- Massot-Cladera, M, Pérez-Brezo, T, Abril-Gil, M, Franch, A, Castell, M, y Pérez-Cano, F. J. (2011). Cocoa Polyphenols Intake in Rats Modulates the Colonic Cross-talk between Intestinal Microbiota and Immune System. 5th Conference International on Polyphenols and Health. Sitges (Barcelona).
- Mataix, E. y Luque de Castro, M. D. (2001). Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I280) and desntity in wines by flow injection. *Analyst*. 126(2);251-255.
- Matthews, D., Wallance, T., y Levy, J. (2004). Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*. 27(6);1487-1495.
- Matsuki, M. (1996). Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Aust J Bot*. 44;613-634.
- Mattila, P. y Kumpulainen, J. (2001). Coenzymes Q₉ and Q₁₀: Contents in Foods and Dietary Intake. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14(4);409-417.
- Mauray, A., Milenkovic, D., Besson, C, Caccia, N., Morand, C., Michel, F., Mazur, A., Scalbert, A., y Felgines, C. (2009). Atheroprotective Effects of Bilberry Extracts in Apo E-Deficient Mice. *Journal agricultural and food chemistry*. 57;11106-11111.
- Middelton, E., Kandaswami, C., y Theoharides, T. C. (2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 52(4);673-751.
- Millan, J., Pinto, X., Munoz, A., Zuriga, M., Rubies-Prat, J., y Pallardo, L. F. (2009). Lipoprotein 35 ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular Health and Risk Management*. 5;757-765.
- Miller, D. D., Schriker, R. B., Rasmussen, R. R., y Campen, D. V. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*. (34);2248-2256.
- Mishra, J., Yousuf, A., Singh, R. D., y Aradhana, A. (2009). Phytochemical investigation and *in-vitro* antioxidant potential of leaves of *Murraya koenigii*. *International Journal of Integrative Biology*. 7(3);171-174.
- Monagas, M, Urpí-Sardà, M, Sánchez-Patán, F, Garrido, L, Llorach, R, Gómez-Cordovés, C, Andrés-Lacueva, C, y Bartolomé, B. (2010). Insights into

the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food and Function*. 1;233-263.

- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., y Ricardo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L.Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem*. 51(22);6475-6481.
- Montagut, G., Baiges, I., Valls, J., Terra, X., del Bas, J. M., Vitrac, X., Richard, T., Mérillon, J. M., Arola, L., Blay, M., Bladé, C., ernandez-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., y Ardévol, A. (2009). A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food Chemistry*. 116;265-270.
- Montilla, P., Espejo, I., Muñoz, M. C., Bujalance, I., Muñoz-Castañeda, J. R., y Tunez, I. (2006). Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. *Clinical Nutrition*. 25(1);146-153.
- Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andres-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., y Queipo-Ortuño, M. I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food and Function*.
- Mori, T. A., Burke, V., Beilin, L. J., y Puddey, I. B. (2015). Randomized Controlled Intervention of the Effects of Alcohol on Blood Pressure in Premenopausal Women. *Hypertension*. 66;517-523.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*. 16(65 (1-2));55-63.
- Mukamal, K. J., Chen, C. M., Rao, S. R., y Breslow, R. A. (2010). Alcohol consumption and cardiovascular mortality among U.S. adults, 1987 to 2002. *Journal American College Cardiology*. 55(13);1328-1335.
- Muñoz-González, I., Thrunheer, T., Bartolomé, B., y Moreno-Arribas, M. V. (2014). Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. *Journal agricultural and food chemistry*. 62;4731-4737.
- Nadal, M. y Arola, L. (1995). Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi-arid conditions. *Vitis*. 34(3);151-154.
- National of Health Institute. (2016a). Vitamin C. <https://www.nih.gov/>.
- National of Health Institute. (2016b). Vitamin E. <https://www.nih.gov/>.

- Nehlig, A. (2012). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 75(3);716-727.
- Nieto, J. A. (2015). Estudio integral de la uva (*Vitis vinifera* L.) como fuente de compuestos fenólicos biodisponibles de acción biológica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid
- Noguer, M. A., Cerezo, A. B., Donoso Navarro, E, y García-Parrilla, M. C. (2012). Alcohol free red wine intake modulates the activities of antioxidant enzymes.
- Noguer, M., Cerezo, A. B., Rentzsch, M., Winterhalter, P., Troncoso, A. M., y García-Parrilla, M. C. (2008). Simulated Digestion and Antioxidant Activity of Red Wine Fractions Separated by High Speed Countercurrent Chromatography. *Food Chemistry*. 56;8879-8884.
- Novelli, M., D'Aleo, V., Lupi, R., Paolini, M., Merchetti, P., Soleti, A., y Masiello, P. (2007). Reduction of oxidative stress by new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonbese mouse diabetes model. *Pancreas*. 35(4);e10-7.
- Oak, M. H., El Bedoui, J., Anglard, P., y Schini-Kerth, V. B. (2004). Red Wine Polyphenolic Compounds Strongly Inhibit Pro-Matrix Metalloproteinase-2 Expression and Its Activation in Response to Thrombin via Direct Inhibition of Membrane Type 1–Matrix Metalloproteinase in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 110;1861-1867.
- OCDE. (2002). OCDE. Guidelines for testing of chemicals.
- Oi, N., Hashimoto, T., y Kanazawa, K. (2008). Metabolic conversion of dietary quercetin forms its conjugate to active aglycone following the introduction of hepatocarcinogenesis in fischer 344 rats. *Journal Agr Food Chem*. 58;577-583.
- OIV. (2009). Indice de Folin-Ciocalteu. Méthode OIV-MA-AS2-10.
- OMS. (2016). Organización Mundial de la Salud. Cardiovascular diseases. http://www.who.int/cardiovascular_diseases
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M-P., Macià, A., y Motilva, M-J. (2009). Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an in Vitro Digestion Model. *Journal agricultural and food chemistry*. 57;5743-5749.
- Otteneder, H., Marx, R., y Olschimke, D. (2004). Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. *Bulletin de l'O I V Revue Internatuinale*. 77(877-878);254-275.

- Pandey, K. B. y Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(5);270-278.
- Pandey, K. B. y Rizvi, S. I. (2010). Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative insult. *Phytotherapy Research*. 24;S1-S14.
- Parr, A. J. y Bolwell, G. P. (2000). Phenols in plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7);985-1012.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J. N., Wang, J-Y., y Yu, L. L. (2006). Chemical Compositions, Antioxidant Capacities, and Antiproliferative Activities of Selected Fruit Seed Flours. *Journal agricultural and food chemistry*. 54;3773-3778.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., y Mattivi, F. (2005). Fast acces of Some Grape Pigments to the Brain. *Journal Agr Food Chem*. 53;7029-7034.
- Pellegrini, N., Salvatore, S., Valtueña, S., Bedogni, G., Porrini, M., Pala, V., Del Rio, D., Sieri, S., Miglio, C., Krogh, V., Zavaroni, I., y Brighenti, F. (2007). Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire for the Assessment of Dietary Total Antioxidant Capacity. *Food of Nutrition Nutritional Epidemiology*. 137;93-98.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., y Scalbert, A. (2010). Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J Agric Food Chem*. 58;4959-4969.
- Pillet, J. (2011). Impact du microclimat sur le métabolisme de la baie de raisin. Université Bordeaux
- Pinelo, M., Arnous, A., y Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*. 17;579-590.
- Piskula, M. K., Yamakoshi, J., y Iwai, Y. (1999). Diadzen and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters*. 447;287-291.
- Poussier, M., Guilloux-Benatier, M., Heras, E., Torres, M., y Adrian, M. (2003). Influence of different maceration techniques and microbial enzymatic activities on wine stilbene content. *American Journal of Enology and Viticulture*. 54(4);261-266.
- Presti, R. L., Carollo, C., y Caimi, G. (2007). Wine consumption and renal diseases: new perspectives. *Nutrition*. 23(7);598-602.

- Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J. A., y Murado, M. A. (2012). β -Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate. *Journal Agr Food Chem.* 60(36);8983-8993.
- Rajdl, D., Racek, J., Trefil, L., y Siala, K. (2006). Effect of white wine consumption on oxidative stress markers and homocysteine levels. *Physiological Research.* 56(2);203-212.
- Ramanathan, L. y Das, N. P. (1992). Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 40(1);17-21.
- Ramirez, A. C. (2009). Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales.
- Randhir, R., Lin, Y. T., y Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in reponse to peptide and phytochemical elicitors. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 13;295-307.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* 26(9/10);1231-1237.
- Rechner, A. R, Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., y Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med.* 33;220-235.
- Reddi, A. R. y Culotta, V. C. (2011). Regulation of Manganese Antioxidants by Nutrient Sensing Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 189(4);1261-1270.
- Reig, M., Aristoy, M. C., y Toldrá, F. (2015). Sources of variability in the analysis of meat nutrient coenzyme Q₁₀ for food composition databases. *Food Control.* 48;151-154.
- Renaud, S. y De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and french paradox for coronary artery disease. *Lancet.* 339;1523-1526.
- Reportlinker (2012). <http://www.reportlinker.com>.
- Reynier, A. (2007). Manuel de viticulture. 10, vol . TEC&DOC.
- Ribéreau-Gayon, J. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique.* 52;627-631.
- Ribéreau-Gayon, P. (1972). Plant phenolics. Hafner Publishing Company;
- Ribéreau-Gayon, P. (2006). Handbook of enology. Ed. Jonh Willey & Sons; Vol 2;

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., y Dubourdieu, D. (2000). Handbook of Enology. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments. Wiley. 2;2;
- Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., Samson, A., y Bourzeix, M. (1993). Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hiperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am J Enol Vitic.* 44;168-172.
- Rodrigo, R. y Bosco, C. (2005a). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 142(3-4);317-327.
- Rodrigo, R., Castillo, R., Carrasco, R., Huerta, P., y Moreno, M. (2005b). Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the *in vitro* antioxidant capacity of wine. *Life Sciences.* 76(8);889-900.
- Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., Curiel, J. A., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., y Muñoz, R. (2007). Metabolismo de compuestos fenólicos por bacterias lácticas del vino. *ACE Revista de Enología.*
- Rodríguez-Delgado, M. A., González-Hernández, G., Conde-González, J. E., y Pérez-Trujillo, J. P. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry.* 78;523-532.
- Roggero, J. P. y Garciaparrilla, C. (1995). Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Science of Aliments.* 15;411-422.
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, M. J., Fernandez-Fernandez, J. I., y Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *Am J Enol Vitic.* 56(3);212-219.
- Ronksley, P. E., Brien, S. E., Turner, B. J., Mukamal, K. J., y Ghali, W. A. (2011). Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systemic review and meta-analysis. *British medical journal.*
- Rosenblat, M., Volkova, N., Attias, J., Mahamid, R., y Aviram, M. (2010). Consumption of polyphenolic-rich beverages (mostly pomegranate and black currant juices) by healthy subjects for a short term increased serum antioxidant status, and the serum's ability to attenuate macrophage cholesterol accumulation. *Food and Function.* 1;99-109.
- Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotilio, D., de Gaetano, G., Evangelista, V., y Cerletti, C. (1998). Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *British Journal of Pharmacology.* 123;1691-1699.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkoulioti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D., y Boutaris, I. (2008). Antioxidant activities of some Greek wines

and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21;614-621.

- Ruiz-Rodríguez, A., Fornani, T., Jaime, L., Vázquez, E., Amador, B., Nieto, J. A., Yuste, M., Mercader, M., y Reglero, G. (2012). Supercritical CO₂ extraction applied toward the production of a functional beverage from wine. *The Journal of Supercritical Fluids*. 61;92-100.
- Samanidou, V. F., Antoniou, C. V., y Papadoyannis, I. N. (2001). Gradient RP-HPLC determination of free phenolic acids in wines and wine vinegar samples after SPE, with photodiode array identification. *Journal of liquid chromatography and related technologies*. 24(14);2161-2176.
- Samoylenko, A., Al Hossain, J. A., Mennerich, D., kellokumpu, S., Kalervo Hiltunen, J., y Kietzmann, T. (2013). Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer:from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxidant and redox signaling*. 19(17);2157-2195.
- Santos-Buelga, C. y Scalbert, A. (2000). Procyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*. 80(7);1094-1117.
- Saremi, A. y Arora, R. (2008). The cardiovascular implications of alcohol and red wine. *American Journal of Therapeutics*. 15(3);265-277.
- Saude, E. J. y Sykes, B. (2007). Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics*. 3(1);19-27.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Faivre, B., Bessis, R., y Fournioux, J. C. (1995). Development of methods, using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica*. 86;41-47.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of ployphenols. *Journal of Nutrition*. 130;2073S-2085S.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., y Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic Res*. 36(2);177-187.
- Scholtz, R. W., Reddy, P. V., Wynn, M. K., Graham, K. S., Liken, A. D., Gumpricht, E., y Reddy, C. C. (1997). Glutathione-dependent factors and inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 23;815-828.
- Schroeder, E. K., Kelsey, N. A., Doyle, J., Breed, E., Bouchard, R. J., Loucks, A., Harbison, A., y Linseman, D. A. (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective anti-apoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxidant and redox signaling*. 11(3);469-480.

- Sen, I. y Tokalti, F. (2014). Authenticity of wines made with economically important grape varieties grown in Anatolia by their phenolic profiles. *Food Control*. 46;446-454.
- Šeruga, M, Novak, M, y Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 124;1208-1216.
- Shaheen, S. O., Sterne, J. A., Thomson, R. L., Songhurst, C. E., Mergetts, B. M., y Burney, P. G. (2002). Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 164(1);823-828.
- SENC (2004). Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. <http://www.nutricioncomunitaria.org>.
- Shahidi, F. y Naczki, M. (1995). Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnnomic, Publishing CO., vol .Lancaster, Pennsylvania, USA
- Shakibaei, M., Harikumar, K. B., y Aggarwal, B. B. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*. 53;115-128.
- Sherwin, E. R. (1978). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of American Oil Chemists Society*. 55(11);809-814.
- Shinohara, K, Ohashi, Y, Kawasumi, K, Terada, A, y Fujisawa, T. (2010). Effect of apple intake on fecal microbiaota and metabolites in humans. *Anaerobe*. 16(5);510-515.
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic*. 16;144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299;152-178.
- Skibola, C. F. y Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*. 29(3-4);375-383.
- Slowing, K., Ganado, P., Sanz, M., Ruiz, E., y Tejerina, T. (2001). Study of Garlic Extracts and Fractions on Cholesterol Plasma Levels and Vascular Reactivity in Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Nutrition*. 131(3);9945-9995.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., y Goldberg, D. M. (1997a). Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone? *Clinical Biochemistry*. 30;91-113.

- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., y Goldberg, D. M. (1997b). Wine as biological fluid: history, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 11;287-313.
- Soleas, G. J., Grass, L., Josephy, D., Golberg D.M., y Diamandis E.P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*. 35;119-124.
- Sparwel, J., Vantler, M., Caglayan, E., Kappert, K., Fries, J. W., Dietrich, H., Böhm, M., Erdmann, E., y Rosenkranz, S. (2009). Differential effects of red and white wines on inhibition of the platelet-derived growth factor receptor: impact of the mash fermentation. *Cardiovascular Research*. 81;758-770.
- Spencer, J., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S. K., Tyrrell, R., Hakn, U., y Rice-Evans, C. (2001). Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3'-*o*-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochemical Journal*. 354;493-500.
- Steinbrecher, U. P. (1987). Oxidation of human low density lipoprotein results in derivivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products.. *Journal of biological Chemistry*. 262;3603-3608.
- Stoclet, J. C, Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M. H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., y Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*. 500;299-313.
- Stratil, P, Kubán, V, y Fojtová, J. (2008). Comparaison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determinated by Spectrophotometric Methods. *Czech J Food Sci*. 26;242-253.
- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Stroöm, E. C., Jacobs, D. R., Ose, L., y Blomhoff, R. (2004). Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine, and Vegetables Are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans. *The Journal of Nutrition*. 134;562-567.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. 120;599-606.
- Taguchi, K., Motohashi, H., y Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 16;123-140.
- Taiz, L y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I. 2;
- Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W., y Shapira, L. (1999). Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor- κ B. *Infection and Immunity*. 67;5573-5578.

- Tanveer, A., Farooq, U., Akram, K., Hayat, Z., Shafi, A., Nazar, H., y Ahmad, Z. (2015). Pomegranate Extracts: A Natural Preventive Measure against Spoilage and Pathogenic Microorganisms. *Food Reviews International*. 31;29-51-
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., y Zajaç, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 64(2);79-84.
- Tatsuno, T., Jinno, M., Arima, Y., Kawabata, T., Hasegawa, T., Yahagi, N., Takano, F., y Ohtaa, T. (2012). Anti-inflammatory and Anti-melanogenic Proanthocyanidin Oligomers from Peanut Skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 35(6);909-916.
- Teixeira, A., Baenas, M., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D., y Garcia-Viguera. (2014a). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int J Mol Sci.* 15;15638-15678.
- Teixeira, A., Baenas, N., Doinguez-Perles, R., Rosa, E., Moreno, D. A, y Garcia-Viguera, C. (2014b). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 15;15638-15678.
- Terpinc, P., Bezjak, M., y Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*. 115(2);740-744.
- Tjonneland, A., Gronbaek, M., Stripp, C., y Overvad, K. (1999). Wine intake and diet in a random sample of 48763 Danish men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69;49-54.
- Tomás-Barberán, F. A y Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80;1073-1080.
- Tomás-Barberán, F. A y Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric.* 81;853-876.
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., Dávalos, A., Gil-Zamorano, J., Gonzalez, M., Garcia-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., y Garcia-Conesa, M. T. (2013). One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacological Research*. 72;69-82.
- Tourtoglou, C., Nenadis, N., y Paraskevopoulou, A. (2014). Phenolic composition and radical scavenging activity of commercial Greek white wines from

- Vitis vinifera* L. cv. Malagousia. Journal of Food Composition and Analysis. 33;166-174.
- Traber, M. G. (1997). Vitamin E, oxidative stress and 'healthy ageing'. European Journal of Clinical Investigation. 27(10);822-824.
- U.S.Department of Agriculture, U. S. Department of Health and Human Services. (2010). Dietary Guidelines for Americans .
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Touriño, S., Torres, J. L., y Vinardell, M. P. (2007). Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. Chemical in research toxicology. 20(10);1543-1548.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., y Vinardell, M. P. (2008). Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. Bioresource Technology. 996683-6687.
- Umoh, N. A., Walker, R. K., Al-Rubaiee, M., Jeffress, M. A., y Haddad, G. E. (2014). Acute Alcohol Modulates Cardiac Function as PI3K/Akt Regulates Oxidative Stress. Alcoholism, clinical and experimental research.
- Urpí-Sardà, M. (2008). Perfil metabólico de resveratrol, flavanoles e isoflavonas en tejidos biológicos administrados a dosis dietéticas. Nuevas metodologías analíticas. Tesis doctoral. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventos, R. M., Jauregui, O., de la Torre, R., Covas, M. I., Estruch, R., Jaeger, W., Andrés-Lacueva, C., y Miksits, M. (2005). Uptake of Diet Resveratrol into the Human Low-Density Lipoprotein. Identifications and Quantification of Resveratrol Metabolites by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem. 77(10);3149-3155.
- Valls, J. (2004). Composició fenòlica en varietats negres de *Vitis vinifera*. Influència de diferents factors.
- Van Velzen, E. J. J., Westerhuis, J. A., Grün, C. H., Jacobs, D. M., Eilers, P. H. C., Mulder, T. P., Foltz, M., Garczarek, U., Kemperman, R., Vaughan, E. E., van Duynhoven, J. P. M., y Smilde, A. K. (2014). Population-based nutrikintic modeling of polyphenol exposure. Metabolomics. 10;1059-1073.
- Villaño, D., Fernandez-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., y Garcia-Parrilla, M. C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. Food Chemistry. 95;394-404.
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtoni, C., y Galli, C. (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. European Journal of Nutrition. 44(2);121-127.

- von Gadow, A., Joubert, E., y Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. J Agric Food Chem. 45;632-638.
- Vrèek, I. V., Bojiæ, M., Zuntar, I., Mendaš, G., y Mediaë-Šariæ, M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. Food Chemistry. 124;354-361.
- Vuorinen, H., Määttä, K., y Törrönen, R. (2000). Content of the Flavonols Myricetin, Quercetin, and Kaempferol in Finish Berry Wines. J Agric Food Chem. 48;2675-2680.
- Walker, A. R., Lee, E., y Robinson, S. P. (2006). Two new grapes cultivars, bud sports of Cabernet sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. Plant molecular biology. 62;623-635.
- Walzem, R. L. (2008). Wine and health: state of proofs and research needs. Inflammopharmacology. 16;265-271.
- Wasaporn, C., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J., y Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. Food Chem Toxicol. 1;254-259.
- Wefers, H. y Sies, H. (1988). The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. European Journal of Biochemistry. 30;353-357.
- Wijngaard, H. y Brunton, N. (2009). The Optimization of Extraction of Antioxidants from Apple Pomace by Pressurized Liquids. Journal agricultural and food chemistry. 57;10625-10631.
- Wootton-Beard, C. P., Moran, A., y Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. Food Research International. 44;217-224.
- Xi, Z., Zhang, Z., Cheng, Y., y Li, H. (2010). The Effect of Vineyard Cover Crop on Main Monomeric Phenols of Grape Berry and Wine in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. Agricultural Sciences in China. 9(3);440-448.
- Xin Yan, Oon. (2010). Antioxidant activities, total phenolic and total flavonoid content of three sabath tropical seaweeds extracts. Science with honors in food science and nutrition. University Malaysia Sabah
- Xu, Y., Khaoustov, V. I., Wang, H., Yu, J., Tabassam, F., y Yoffe, B. (2009). Freeze-Dried Grape Powder Attenuates Mitochondria- and Oxidative

Stress-Mediated Apoptosis in Liver Cells. Journal agricultural and food chemistry. 57;9324-9331.

- Yilmaz, Y. y Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. J Agric Food Chem. 52(2);255-260.
- Yubero, N., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Villanueva, S, Carrión, J. M., Larrarte, E., y Moro, C. (2013). LDL cholesterol-lowering effects of grape extract used as a dietary supplement on healthy volunteers. Int J Food Sciences and Nutrition. 64(4);400-406.
- Yubero-Serrano, E. M., Garcia-Rios, A., Delgado-Lista, J., Pérez-Martinez, P., Camargo, A., Perez-Jimenez, F., y Lopez-Miranda, J. (2014). Coenzyme Q₁₀ as an Antioxidant in the Elderly. Academic Press;11;109-117.
- Zamora-Ros, R., Urpí Sardà, M., Lamuela-Raventos, R. M., Estruch, R, Vázquez-Agell, M., Serrano-Martínez, M., Jaeger, W., y Andres-Lacueva, C. (2006). Diagnostic Performance of Urinary Resveratrol Metabolites as a Biomaker of Moderate Wine Consumption. Clin Chem. 52(7);1373-1380.
- Zhang, A., Fang, Y., Wang, H., Li, H., y Zhang, Z. (2011). Free-Radical Scavenging Properties and Reducing Power of Grape Cane Extracts from 11 Selected Grape Cultivars Widely Grown in China. Molecules. 16;10104-10122.
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., y Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. International Journal of Food Microbiology. 151(2);210-215.

7. ANEXO

Tabla A.1. Valor TEAC (mmol trolox/L) mediante el método del radical DPPH• de los extractos de variedades de uva blanca.

| VAR. | Extracto acuoso | Extracto etanólico |
|-------------|------------------------|---------------------------|
| AL | 3,36 ± 0,28* | 18,85 ± 2,89 |
| CH | 6,01 ± 1,03 | 16,18 ± 1,31 |
| CB | 2,75 ± 0,04 | 13,04 ± 1,35 |
| FB | 7,95 ± 1,24 | 18,70 ± 1,54 |
| FI | 2,69 ± 0,20 | 9,85 ± 0,77 |
| GB | 4,54 ± 0,21 | 8,62 ± 1,19 |
| GW | 11,64 ± 1,28 | 21,79 ± 1,53 |
| MC | 0,22 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 |
| MA | 0,52 ± 0,14 | 0,82 ± 0,37 |
| MF | 2,09 ± 0,15 | 7,83 ± 0,89 |
| MR | 13,00 ± 0,74 | 22,30 ± 1,50 |
| PA | 3,65 ± 0,42 | 6,98 ± 2,24 |
| RI | 13,62 ± 3,14 | 30,14 ± 0,80 |
| RO | 14,99 ± 2,16 | 23,51 ± 1,07 |
| SB | 0,81 ± 0,08 | 2,35 ± 0,42 |
| UB | 2,80 ± 0,39 | 7,60 ± 0,45 |
| VAR 31 | 5,42 ± 0,28 | 14,31 ± 0,96 |
| VE | 2,51 ± 0,17 | 8,32 ± 0,24 |
| VG | 7,50 ± 1,64 | 25,31 ± 0,12 |
| XA | 0,43 ± 0,04 | 8,23 ± 0,33 |

* Media ± S.D.

Tabla A.2. Actividad Antioxidante mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA) de los extractos acuosos de variedades de uva blanca

| VAR. | Sin diluir | Dilución 1/5 | Dilución 1/10 |
|-------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| AL | 90 \pm 3* | 66 \pm 2 | 56 \pm 5 |
| CH | 93 \pm 1 | 74 \pm 0 | 51 \pm 2 |
| CB | 93 \pm 1 | 64 \pm 1 | 66 \pm 6 |
| FB | 93 \pm 0 | 81 \pm 2 | 76 \pm 2 |
| FI | 95 \pm 1 | 78 \pm 3 | 70 \pm 4 |
| GB | 98 \pm 1 | 88 \pm 1 | 84 \pm 2 |
| GW | 98 \pm 1 | 89 \pm 1 | 85 \pm 2 |
| MC | 36 \pm 3 | 13 \pm 2 | 3 \pm 4 |
| MA | 71 \pm 4 | 31 \pm 6 | 14 \pm 8 |
| MF | 87 \pm 1 | 64 \pm 8 | 54 \pm 4 |
| MR | 97 \pm 1 | 90 \pm 1 | 87 \pm 1 |
| PA | 98 \pm 1 | 69 \pm 2 | 56 \pm 3 |
| RI | 96 \pm 0 | 89 \pm 1 | 86 \pm 3 |
| RO | 95 \pm 2 | 88 \pm 2 | 83 \pm 5 |
| SB | 84 \pm 2 | 58 \pm 2 | 47 \pm 7 |
| UB | 92 \pm 1 | 76 \pm 7 | 66 \pm 5 |
| VAR 31 | 93 \pm 3 | 82 \pm 2 | 77 \pm 1 |
| VE | 92 \pm 1 | 75 \pm 1 | 67 \pm 3 |
| VG | 96 \pm 2 | 82 \pm 5 | 73 \pm 6 |
| XA | 74 \pm 8 | 55 \pm 7 | 47 \pm 7 |

* Media \pm S.D.

Tabla A.3. Actividad Antioxidante mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA) de los extractos etanólicos de variedades de uva blanca.

| VAR. | Sin diluir | Dilución 1/5 | Dilución 1/10 |
|-------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| AL | 96 \pm 1* | 89 \pm 4 | 88 \pm 2 |
| CH | 96 \pm 2 | 87 \pm 10 | 76 \pm 3 |
| CB | 98 \pm 2 | 82 \pm 2 | 83 \pm 2 |
| FB | 97 \pm 1 | 94 \pm 1 | 92 \pm 0 |
| FI | 98 \pm 1 | 91 \pm 1 | 88 \pm 5 |
| GB | 99 \pm 0 | 90 \pm 2 | 85 \pm 2 |
| GW | 99 \pm 1 | 95 \pm 1 | 93 \pm 5 |
| MC | 47 \pm 2 | 28 \pm 6 | 20 \pm 3 |
| MA | 82 \pm 7 | 57 \pm 9 | 46 \pm 7 |
| MF | 99 \pm 0 | 85 \pm 1 | 77 \pm 15 |
| MR | 99 \pm 0 | 95 \pm 0 | 94 \pm 2 |
| PA | 93 \pm 1 | 77 \pm 4 | 70 \pm 5 |
| RI | 98 \pm 4 | 95 \pm 0 | 92 \pm 2 |
| RO | 98 \pm 0 | 93 \pm 0 | 91 \pm 1 |
| SB | 92 \pm 2 | 66 \pm 1 | 55 \pm 4 |
| UB | 98 \pm 0 | 90 \pm 1 | 87 \pm 3 |
| VAR 31 | 97 \pm 1 | 90 \pm 0 | 87 \pm 3 |
| VE | 98 \pm 0 | 90 \pm 4 | 87 \pm 1 |
| VG | 98 \pm 3 | 91 \pm 1 | 88 \pm 2 |
| XA | 98 \pm 0 | 87 \pm 4 | 81 \pm 1 |

* Media \pm S.D.

Tabla A.4. Índice de Polifenoles Totales de los extractos de variedades de uva blanca.

| VAR. | IPT acuoso | IPT etanólico |
|--------|-------------|---------------|
| AL | 15,1 ± 1,4* | 56,8 ± 7,4 |
| CH | 22,2 ± 0,3 | 44,4 ± 4,1 |
| CB | 13,1 ± 0,3 | 35,3 ± 3,5 |
| FB | 21,6 ± 3,3 | 47,7 ± 1,6 |
| FI | 7,6 ± 0,2 | 24,4 ± 0,2 |
| GB | 23,6 ± 1,6 | 28,6 ± 3,1 |
| GW | 30,9 ± 5,2 | 49,0 ± 6,5 |
| MC | 4,3 ± 0,6 | 5,2 ± 1,1 |
| MA | 3,3 ± 0,1 | 3,2 ± 0,1 |
| MF | 4,5 ± 1,2 | 19,6 ± 2,2 |
| MR | 35,7 ± 3,4 | 61,0 ± 1,1 |
| PA | 11,6 ± 0,4 | 19,8 ± 4,5 |
| RI | 43,1 ± 9,6 | 82,9 ± 4,9 |
| RO | 42,8 ± 5,1 | 66,3 ± 5,5 |
| SB | 5,3 ± 0,1 | 9,9 ± 0,5 |
| UB | 6,7 ± 1,4 | 17,2 ± 0,7 |
| VAR 31 | 15,8 ± 0,1 | 36,8 ± 0,3 |
| VE | 8,4 ± 0,7 | 22,9 ± 0,8 |
| VG | 24,8 ± 6,0 | 65,2 ± 3,1 |
| XA | 4,7 ± 0,4 | 23,2 ± 0,9 |

* Media ± S.D.

Tabla A.5. Composición fenólica de los extractos acuosos de variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Catequina | Epicatequina | Ác. gálico | Ác. siríngico | Ác. vainílico | Ác. ferúlico | Ác. t-caféico | Ác. p-cumárico |
|-------|---------------|--------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|----------------|
| AL | n.d. | 5,03 ± 3,46 | 0,60 ± 0,08 | n.d. | n.d. | 0,02 ± 0,01 | n.d. | n.d. |
| CB | n.d. | n.d. | 0,19 ± 0,09 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,04 ± 0,02 | n.d. |
| CH | n.d. | n.d. | 0,26 ± 0,04 | 0,08 ± 0,00 | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,02 | n.d. |
| FB | 2,99 ± 1,36 | 2,62 ± 2,68 | 0,51 ± 0,52 | n.d. | 0,03 ± 0,02 | n.d. | n.d. | n.d. |
| FI | 1,39 ± 0,25 | 0,54 ± 0,25 | 0,46 ± 0,08 | n.d. | 0,07 ± 0,05 | n.d. | n.d. | n.d. |
| GB | 2,03 ± 1,25 | 1,73 ± 1,00 | 0,16 ± 0,05 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,13 ± 0,05 | n.d. |
| GW | 23,54 ± 16,83 | 4,74 ± 4,25 | 0,71 ± 0,84 | n.d. | 0,08 ± 0,04 | n.d. | n.d. | n.d. |
| MA | n.d. | n.d. | 0,05 ± 0,02 | n.d. | n.d. | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,01 | n.d. |
| MC | 0,82 ± 0,39 | n.d. | 0,16 ± 0,03 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 |
| MF | n.d. | n.d. | 0,19 ± 0,01 | n.d. | 0,17 ± 0,03 | n.d. | n.d. | n.d. |
| MR | n.d. | n.d. | 0,87 ± 0,04 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PA | 3,18 ± 0,06 | n.d. | 0,25 ± 0,12 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,00 |
| RI | 1,65± 1,23 | n.d. | 0,11 ± 0,01 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,22 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| RO | 51,87 ± 0,32 | n.d. | 0,18 ± 0,20 | 0,45 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | n.d. | n.d. | n.d. |
| SB | n.d. | n.d. | 0,40 ± 0,00 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| UB | 12,40 ± 8,01 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR31 | 7,13 ± 0,52 | n.d. | n.d. | 0,12 ± 0,07 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VE | 57,14 ± 33,17 | n.d. | n.d. | 0,33 ± 0,16 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VG | n.d. | 0,94 ± 0,45 | 0,48 ± 0,24 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| XA | n.d. | n.d. | 0,24 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.5. (Cont.) Composición fenólica de los extractos acuosos de variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Cis-piceido | Trans-piceido | Trans-resveratrol | Quercetina 3-O-glucósido | Quercetina 3-O-galactósido |
|-------------|--------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| AL | 1,22 ± 0,03* | 0,035 ± 0,002 | n.d. | 7,31 ± 0,81 | 3,65 ± 0,16 |
| CB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3,53 ± 0,22 |
| CH | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| FB | n.d. | n.d. | n.d. | 5,16 ± 0,82 | 7,56 ± 3,84 |
| FI | n.d. | n.d. | n.d. | 5,58 ± 2,04 | 5,80 ± 2,81 |
| GB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3,91 ± 1,07 |
| GW | 0,35 ± 0,26 | n.d. | n.d. | 4,89 ± 0,13 | n.d. |
| MA | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MC | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MF | n.d. | n.d. | n.d. | 6,17 ± 1,05 | n.d. |
| MR | n.d. | n.d. | 0,21 ± 0,03 | 7,24 ± 0,04 | 6,24 ± 0,08 |
| PA | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| RI | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| RO | n.d. | n.d. | n.d. | 13,8 ± 1 | 7,77 ± 0,19 |
| SB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| UB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR31 | n.d. | n.d. | n.d. | 3,49 ± 4,94 | 2,83 ± 4,01 |
| VE | n.d. | n.d. | n.d. | 5,05 ± 0,21 | 3,34 ± 0,14 |
| VG | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| XA | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.6. Composición fenólica de los extractos etanólicos de variedades de uva blanca (mg/L extracto)

| VAR. | Catequina | Epicatequina | Á. gálico | Ác. siríngico | Ác. vainílico | Ác. ferúlico | Ác. t-caféico | Ác. p-cumárico |
|-------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|----------------|
| AL | 20,84 ± 6,58* | 80,56 ± 15,95 | 3,00 ± 0,06 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CB | 0,16 ± 0,01 | 0,34 ± 0,48 | 0,33 ± 0,06 | 0,08 ± 0,00 | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,01 | n.d. |
| CH | 7,41 ± 1,45 | 8,21 ± 0,96 | 0,19 ± 0,03 | 0,05 ± 0,03 | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,02 | 0,01 ± 0,01 |
| FB | 2,73 ± 0,28 | 3,28 ± 1,12 | 2,14 ± 0,28 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| FI | 3,02 ± 2,93 | 2,26 ± 2,23 | 1,48 ± 1,06 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| GB | 1,08 ± 0,04 | 1,01 ± 0,87 | 0,33 ± 0,01 | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,00 | 0,48 ± 0,01 | n.d. |
| GW | 80,3 ± 0,18 | 24,68 ± 1,81 | 2,51 ± 0,72 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MA | n.d. | n.d. | 0,26 ± 0,12 | n.d. | n.d. | 0,01 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 |
| MC | 0,82 ± 0,39 | 1,94 ± 0,82 | 0,46 ± 0,12 | n.d. | n.d. | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| MF | 4,25 ± 3,51 | 1,35 ± 1,25 | 1,62 ± 0,94 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MR | 19,9 ± 5,45 | 9,5 ± 1,15 | 5,59 ± 0,17 | n.d. | n.d. | 0,61 ± 0,12 | n.d. | n.d. |
| PA | 3,18 ± 0,06 | 1,45 ± 0,18 | 1,1 ± 0,11 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,04 | 0,07 ± 0,10 |
| RI | 51,55 ± 6,84 | 32,38 ± 8,8 | 2,07 ± 0,41 | 0,97 ± 0,34 | 0,39 ± 0,17 | 0,01 ± 0,00 | 0,69 ± 0,04 | 0,02 ± 0,01 |
| RO | 34,86 ± 1,16 | 0,52 ± 0,32 | 0,38 ± 0,32 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| SB | 4,72 ± 1,05 | 9,51 ± 2,17 | 1,5 ± 0,25 | n.d. | n.d. | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 |
| UB | 2,98 ± 0,18 | 5,57 ± 2,15 | 0,51 ± 0,29 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR31 | 1,58 ± 0,43 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VE | 30,46 ± 14,86 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VG | 4,72 ± 1,97 | 41,08 ± 30,25 | 3,14 ± 1,97 | n.d. | 0,11 ± 0,15 | n.d. | n.d. | n.d. |
| XA | 2,79 ± 3,39 | 4,16 ± 4,67 | 0,51 ± 0,22 | 0,11 ± 0,06 | n.d. | n.d. | 0,02 ± 0,01 | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.6. (Cont.). Composición fenólica de los extractos etanólicos de variedades de uva blanca (mg/L extracto)

| VAR. | Cis-piceido | Trans-piceido | Quercetina 3-O-glucósido | Quercetina 3-O-galactósido |
|-------------|--------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| AL | 1,30 ± 0,11* | 0,12 ± 0,01 | 17,00 ± 3,16 | 5,25 ± 0,87 |
| CB | n.d. | n.d. | 12,00 ± 0,72 | 7,42 ± 0,63 |
| CH | n.d. | n.d. | 5,94 ± 2,00 | 1,88 ± 2,66 |
| FB | 0,59 ± 0,02 | n.d. | 4,24 ± 0,19 | n.d. |
| FI | n.d. | n.d. | 22,10 ± 5,2 | n.d. |
| GB | n.d. | n.d. | 6,86 ± 1,19 | 4,49 ± 1,31 |
| GW | 1,38 ± 0,60 | n.d. | 7,23 ± 0,03 | n.d. |
| MA | n.d. | n.d. | 2,18 ± 3,08 | 2,80 ± 0,07 |
| MC | n.d. | n.d. | n.d. | 1,42 ± 2,01 |
| MF | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MR | n.d. | n.d. | 9,10 ± 1,68 | n.d. |
| PA | n.d. | n.d. | 5,47 ± 0,45 | 3,71 ± 0,09 |
| RI | 0,04 ± 0,01 | 0,60 ± 0,08 | 7,60 ± 1,90 | 5,27 ± 1,52 |
| RO | n.d. | n.d. | 18,50 ± 2,06 | n.d. |
| SB | n.d. | n.d. | 2,09 ± 2,95 | n.d. |
| UB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR31 | n.d. | n.d. | 12,20 ± 8,65 | n.d. |
| VE | n.d. | n.d. | 9,34 ± 1,64 | n.d. |
| VG | n.d. | n.d. | 8,43 ± 3,79 | 3,77 ± 0,62 |
| XA | 0,06 ± 0,01 | n.d. | 4,59 ± 0,57 | 2,66 ± 0,14 |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.7. Suma de compuestos fenólicos de los extractos acuosos y etanólicos de variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Acuoso (mg/L) | Etanólico (mg/L) |
|-------|-----------------------------|-------------------------------|
| AL | 17,86 ± 0,97 ^{*bc} | 128,08 ± 18,66 ^a |
| CB | 3,76 ± 0,33 ^c | 20,34 ± 0,92 ^{efg} |
| CH | 0,36 ± 0,02 ^c | 23,72 ± 7,06 ^{efg} |
| FB | 18,87 ± 4,65 ^{bc} | 12,98 ± 0,90 ^{fg} |
| FI | 13,84 ± 0,13 ^{bc} | 28,90 ± 11,42 ^{defg} |
| GB | 7,96 ± 3,42 ^c | 14,29 ± 3,34 ^{fg} |
| GW | 34,33 ± 22,34 ^b | 116,10 ± 1,78 ^{ab} |
| MA | 0,07 ± 0,02 ^c | 5,29 ± 3,29 ^g |
| MC | 1,03 ± 0,42 ^c | 4,69 ± 0,67 ^g |
| MF | 6,53 ± 1,04 ^c | 7,23 ± 5,70 ^g |
| MR | 14,57 ± 0,19 ^{bc} | 44,70 ± 8,57 ^{cde} |
| PA | 3,46 ± 0,18 ^c | 15,02 ± 0,06 ^{fg} |
| RI | 1,99 ± 1,24 ^c | 101,59 ± 13,17 ^b |
| RO | 74,08 ± 1,06 ^a | 54,24 ± 1,54 ^{cd} |
| SB | 0,40 ± 0,00 ^c | 17,84 ± 6,43 ^{efg} |
| UB | 12,40 ± 8,01 ^{bc} | 9,06 ± 2,25 ^g |
| VAR31 | 13,57 ± 9,39 ^{bc} | 13,77 ± 9,08 ^{fg} |
| VE | 65,88 ± 32,99 ^a | 39,80 ± 16,50 ^{cdef} |
| VG | 1,42 ± 0,69 ^c | 61,25 ± 38,74 ^c |
| XA | 0,35 ± 0,02 ^c | 14,91 ± 7,49 ^{fg} |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

^{a,b,c} Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.8. Valor TEAC (mmol Trolox/L) mediante el método del radical DPPH• de los extractos de variedades de uva tinta.

| VAR. | Extracto acuoso | Extracto etanólico |
|-------------|------------------------|---------------------------|
| AB | 15,58 ± 3,27* | 40,33 ± 2,23 |
| BE | 5,37 ± 0,62 | 21,00 ± 0,26 |
| CA | 1,34 ± 0,01 | 11,34 ± 0,74 |
| CF | 4,28 ± 0,96 | 14,87 ± 1,44 |
| CI | 0,96 ± 0,14 | 5,42 ± 0,04 |
| CS | 8,78 ± 0,95 | 26,32 ± 1,46 |
| CT | 2,00 ± 0,17 | 19,17 ± 0,29 |
| GA | 11,76 ± 2,62 | 27,83 ± 0,54 |
| GN | 4,57 ± 0,40 | 12,01 ± 1,64 |
| MN | 11,33 ± 0,18 | 21,54 ± 4,80 |
| MT | 7,45 ± 0,27 | 21,01 ± 0,69 |
| NE | 2,62 ± 0,50 | 16,25 ± 1,06 |
| PAN | 10,54 ± 0,51 | 26,49 ± 2,03 |
| PN | 2,97 ± 0,10 | 7,81 ± 0,10 |
| PV | 13,05 ± 0,35 | 38,92 ± 1,76 |
| SH | 4,45 ± 0,82 | 6,85 ± 0,18 |
| TA | 6,20 ± 0,27 | 38,60 ± 5,76 |
| TE | 4,43 ± 1,05 | 18,44± 0,46 |
| TN | 5,34 ± 0,10 | 29,08 ± 3,81 |
| VAR4 | 13,60 ± 2,04 | 26,18 ± 0,64 |
| VAR8 | 19,41 ± 0,45 | 32,63 ± 0,92 |
| VAR 30 | 25,42 ± 3,12 | 41,01 ± 2,63 |
| VAR 32 | 9,84 ± 0,72 | 30,72 ± 2,24 |
| VAR 33 | 3,24 ± 0,43 | 14,73 ± 1,20 |
| VAR 34 | 7,98 ± 1,08 | 9,86 ± 0,45 |
| ZF | 1,90 ± 0,97 | 10,44± 1,60 |

* Media ± S.D.

Tabla A.9. Actividad Antioxidante mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA) de los extractos acuosos de variedades de uva tinta.

| VAR. | Dilución 1/5 | Dilución 1/10 | Dilución 1/20 |
|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| AB | 99 \pm 1* | 93 \pm 2 | 89 \pm 5 |
| BE | 81 \pm 12 | 75 \pm 17 | 69 \pm 17 |
| CA | 85 \pm 6 | 60 \pm 4 | 35 \pm 3 |
| CF | 61 \pm 9 | 42 \pm 7 | 23 \pm 1 |
| CI | 71 \pm 5 | 48 \pm 7 | 26 \pm 4 |
| CS | 100 \pm 1 | 93 \pm 1 | 84 \pm 6 |
| CT | 90 \pm 3 | 79 \pm 4 | 68 \pm 4 |
| GA | 96 \pm 1 | 74 \pm 2 | 50 \pm 5 |
| GN | 97 \pm 5 | 71 \pm 5 | 44 \pm 6 |
| MN | 98 \pm 1 | 91 \pm 1 | 87 \pm 4 |
| MT | 100 \pm 3 | 93 \pm 3 | 82 \pm 7 |
| NE | 99 \pm 2 | 84 \pm 2 | 70 \pm 2 |
| PAN | 91 \pm 4 | 82 \pm 8 | 72 \pm 3 |
| PN | 98 \pm 3 | 86 \pm 3 | 70 \pm 5 |
| PV | 99 \pm 1 | 93 \pm 2 | 85 \pm 4 |
| SH | 97 \pm 2 | 83 \pm 4 | 65 \pm 9 |
| TA | 86 \pm 2 | 80 \pm 6 | 54 \pm 6 |
| TE | 83 \pm 6 | 64 \pm 13 | 45 \pm 11 |
| TN | 84 \pm 4 | 59 \pm 4 | 35 \pm 3 |
| VAR4 | 89 \pm 4 | 80 \pm 4 | 62 \pm 5 |
| VAR8 | 98 \pm 2 | 74 \pm 4 | 47 \pm 4 |
| VAR 30 | 97 \pm 0 | 94 \pm 0 | 91 \pm 1 |
| VAR 32 | 95 \pm 1 | 92 \pm 0 | 89 \pm 1 |
| VAR 33 | 91 \pm 2 | 72 \pm 4 | 54 \pm 4 |
| VAR 34 | 99 \pm 0 | 87 \pm 1 | 72 \pm 7 |
| ZF | 77 \pm 12 | 50 \pm 9 | 38 \pm 5 |

* Media \pm S.D.

Tabla A.10. Actividad Antioxidante mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno (% AA) de los extractos etanólicos de variedades de uva tinta.

| VAR. | Dilución 1/5 | Dilución 1/10 | Dilución 1/20 |
|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| AB | 98 \pm 1* | 93 \pm 1 | 88 \pm 4 |
| BE | 98 \pm 1 | 94 \pm 2 | 90 \pm 5 |
| CA | 98 \pm 0 | 92 \pm 1 | 87 \pm 6 |
| CF | 98 \pm 1 | 93 \pm 1 | 87 \pm 9 |
| CI | 91 \pm 1 | 86 \pm 2 | 81 \pm 3 |
| CS | 97 \pm 0 | 93 \pm 2 | 89 \pm 2 |
| CT | 99 \pm 3 | 94 \pm 1 | 89 \pm 2 |
| GA | 95 \pm 0 | 91 \pm 1 | 88 \pm 2 |
| GN | 91 \pm 3 | 76 \pm 3 | 62 \pm 3 |
| MN | 98 \pm 1 | 92 \pm 1 | 86 \pm 3 |
| MT | 96 \pm 0 | 94 \pm 1 | 91 \pm 1 |
| NE | 98 \pm 0 | 89 \pm 3 | 80 \pm 10 |
| PAN | 94 \pm 1 | 90 \pm 2 | 86 \pm 3 |
| PN | 99 \pm 2 | 91 \pm 2 | 83 \pm 2 |
| PV | 98 \pm 1 | 95 \pm 0 | 92 \pm 1 |
| SH | 100 \pm 0 | 93 \pm 2 | 85 \pm 2 |
| TA | 96 \pm 0 | 95 \pm 1 | 93 \pm 3 |
| TE | 96 \pm 2 | 90 \pm 3 | 85 \pm 7 |
| TN | 94 \pm 1 | 92 \pm 1 | 89 \pm 2 |
| VAR4 | 98 \pm 1 | 95 \pm 1 | 91 \pm 2 |
| VAR8 | 100 \pm 1 | 95 \pm 1 | 89 \pm 4 |
| VAR 30 | 99 \pm 1 | 97 \pm 0 | 96 \pm 1 |
| VAR 32 | 98 \pm 0 | 96 \pm 0 | 94 \pm 1 |
| VAR 33 | 98 \pm 1 | 87 \pm 1 | 76 \pm 2 |
| VAR 34 | 99 \pm 0 | 86 \pm 0 | 84 \pm 2 |
| ZF | 98 \pm 2 | 88 \pm 4 | 79 \pm 8 |

* Media \pm S.D.

Tabla A.11. Índice de Polifenoles Totales de los extractos de variedades de uva tinta.

| VAR. | IPT acuoso | IPT etanólico |
|-------------|-------------------|----------------------|
| AB | 58,0 ± 8,9* | 139,1 ± 1,9 |
| BE | 28,0 ± 8,0 | 60,4 ± 1,9 |
| CA | 6,7 ± 0,2 | 49,8 ± 2,1 |
| CF | 20,6 ± 3,2 | 58,8 ± 7,0 |
| CI | 4,0 ± 0,3 | 26,7 ± 0,3 |
| CS | 30,2 ± 1,9 | 78,7 ± 8,7 |
| CT | 16,1 ± 0,6 | 83,3 ± 0,3 |
| GA | 30,7 ± 5,5 | 84,7 ± 1,3 |
| GN | 19,2 ± 5,6 | 53,5 ± 0,8 |
| MN | 37,6 ± 1,1 | 70,4 ± 12,2 |
| MT | 54,0 ± 1,7 | 88,5 ± 3,1 |
| NE | 17,5 ± 1,3 | 60,4 ± 1,8 |
| PAN | 36,1 ± 3,4 | 85,6 ± 1,0 |
| PN | 20,7 ± 3,9 | 34,6 ± 4,4 |
| PV | 43,4 ± 0,8 | 119,8 ± 10,9 |
| SH | 24,9 ± 1,4 | 39,4 ± 0,5 |
| TA | 34,7 ± 7,2 | 146,8 ± 19,1 |
| TE | 22,5 ± 3,7 | 69,2 ± 0,6 |
| TN | 29,4 ± 1,8 | 83,5 ± 4,8 |
| VAR4 | 42,9 ± 2,3 | 104,3 ± 14,5 |
| VAR8 | 54,7 ± 4,6 | 103,4 ± 4,9 |
| VAR 30 | 76,4 ± 0,6 | 110,1 ± 0,8 |
| VAR 32 | 41,3 ± 0,5 | 112,0 ± 1,2 |
| VAR 33 | 18,8 ± 1,0 | 52,4 ± 3,7 |
| VAR 34 | 34,6 ± 0,1 | 34,6 ± 0,6 |
| ZF | 12,7 ± 3,1 | 38,1 ± 2,1 |

* Media ± S.D.

Tabla A.12. Composición fenólica de los extractos acuosos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Cianidina 3-O-glucósido | Delfinidina 3-O-glucósido | Malvidina 3-O-glucósido | Peonidina 3-O-glucósido | Petunidina 3-O-glucósido |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| AB | 7,43 ± 2,05* | 7,09 ± 0,46 | 29,18 ± 16,85 | 79,93 ± 60,41 | 9,92 ± 0,45 |
| BE | 6,17 ± 0,46 | 7,06 ± 0,33 | 27,29 ± 2,11 | 12,23 ± 0,82 | 13,09 ± 0,61 |
| CA | 3,04 ± 4,29 | 6,54 ± 0,06 | 27,21 ± 0,37 | 11,82 ± 0,08 | 11,04 ± 0,47 |
| CF | 8,75 ± 1,23 | 7,23 ± 0,92 | 19,03 ± 3,18 | 21,60 ± 4,44 | 12,73 ± 1,86 |
| CI | 2,27 ± 3,21 | n.d. | 11,04 ± 0,37 | 9,39 ± 0,57 | n.d. |
| CS | n.d. | 6,93 ± 0,04 | 17,99 ± 0,98 | 11,47 ± 0,03 | 11,01 ± 0,32 |
| CT | n.d. | 6,08 ± 0,09 | 15,63 ± 3,06 | 10,19 ± 0,61 | n.d. |
| GA | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| GN | 3,00 ± 4,24 | n.d. | 17,08 ± 3,77 | 16,30 ± 3,39 | n.d. |
| MN | 13,24 ± 1,38 | 6,62 ± 0,52 | 22,72 ± 1,67 | 31,07 ± 2,42 | 12,33 ± 2,58 |
| MT | 6,72 ± 1,05 | 6,66 ± 0,35 | 15,93 ± 1,34 | 14,73 ± 3,34 | 10,41 ± 0,85 |
| NE | n.d. | n.d. | 16,56 ± 0,74 | 14,77 ± 0,46 | n.d. |
| PAN | 5,15 ± 0,42 | 5,53 ± 0,39 | 14,49 ± 0,17 | 11,17 ± 0,06 | 8,75 ± 0,58 |
| PN | n.d. | 7,25 ± 0,03 | 18,37 ± 1,41 | 18,19 ± 1,58 | n.d. |
| PV | 6,84 ± 0,50 | 8,41 ± 0,83 | 31,43 ± 3,09 | 15,69 ± 1,42 | 17,25 ± 2,25 |
| SH | 7,07 ± 0,32 | 6,47 ± 0,07 | 19,83 ± 0,12 | 24,93 ± 3,31 | 10,37 ± 0,11 |
| TA | 7,34 ± 0,64 | 7,69 ± 0,71 | 31,81 ± 4,68 | 19,47 ± 1,95 | 15,02 ± 2,01 |
| TE | 7,05 ± 0,29 | 7,38 ± 0,54 | 20,80 ± 1,02 | 17,32 ± 0,68 | 13,55 ± 1,05 |
| TN | 7,50 ± 1,86 | 3,99 ± 5,64 | 27,15 ± 9,43 | 32,27 ± 14,36 | 8,11 ± 11,47 |
| VAR 4 | 3,46 ± 4,89 | n.d. | 21,15 ± 0,33 | 14,97 ± 2,93 | n.d. |
| VAR 8 | 6,54 ± 0,65 | 6,98 ± 0,77 | 23,56 ± 2,46 | 16,78 ± 1,93 | 11,88 ± 1,44 |
| VAR 30 | 6,82 ± 0,48 | 7,53 ± 0,42 | 25,89 ± 4,75 | 26,84 ± 17,20 | 14,10 ± 2,21 |
| VAR 32 | 9,36 ± 0,03 | 9,63 ± 0,34 | 24,86 ± 21,88 | 17,80 ± 11,90 | 18,10 ± 12,32 |
| VAR 33 | 7,97 ± 2,00 | 8,04 ± 1,91 | 17,27 ± 11,15 | 14,20 ± 6,81 | 10,49 ± 1,57 |
| VAR 34 | 6,33 ± 0,04 | 6,55 ± 0,00 | 16,35 ± 0,69 | 20,86 ± 3,33 | 10,19 ± 0,06 |
| ZF | 6,37 ± 0,26 | 3,08 ± 4,36 | 22,96 ± 0,84 | 18,96 ± 2,33 | 5,11 ± 7,22 |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.12 (Cont.). Composición fenólica de los extractos acuosos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Catequina | Epicatequina | Gálico | Siríngico | Vainílico | Ferúlico | Trans-cafeico | p-cumárico |
|-------------|------------------|---------------------|---------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| AB | 0,13 ± 0,19 | n.d. | 1,59 ± 0,25 | 2,18 ± 0,15 | n.d. | n.d. | 1,29 ± 0,98 | 0,22 ± 0,09 |
| BE | n.d. | n.d. | 5,66 ± 0,42 | 0,47 ± 0,35 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,04 ± 0,05 |
| CA | n.d. | 0,40 ± 0,57 | 0,29 ± 0,11 | 1,14 ± 1,24 | n.d. | n.d. | 0,05 ± 0,04 | n.d. |
| CF | 0,09 ± 0,13 | 0,91 ± 1,28 | 1,21 ± 0,07 | n.d. | 0,10 ± 0,05 | n.d. | 0,07 ± 0,04 | n.d. |
| CI | n.d. | n.d. | 0,15 ± 0,11 | 0,17 ± 0,10 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CS | 0,33 ± 0,46 | n.d. | 0,94 ± 0,73 | 0,73 ± 0,03 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CT | n.d. | n.d. | 0,22 ± 0,01 | 0,92 ± 0,09 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| GA | n.d. | n.d. | 0,26 ± 0,05 | 0,16 ± 0,07 | 0,07 ± 0,10 | n.d. | 0,03 ± 0,01 | n.d. |
| GN | 1,09 ± 1,54 | n.d. | 0,73 ± 1,03 | 0,76 ± 0,50 | n.d. | n.d. | 0,01 ± 0,01 | 0,23 ± 0,12 |
| MN | 0,03 ± 0,05 | n.d. | 0,53 ± 0,17 | 0,21 ± 0,06 | n.d. | n.d. | 0,05 ± 0,06 | n.d. |
| MT | n.d. | n.d. | 0,24 ± 0,04 | n.d. | n.d. | 0,03 ± 0,01 | 0,32 ± 0,06 | 0,11 ± 0,13 |
| NE | 0,18 ± 0,02 | n.d. | 0,38 ± 0,14 | 0,78 ± 0,11 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PAN | 0,12 ± 0,07 | n.d. | 0,49 ± 0,08 | 0,65 ± 0,16 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PN | 0,31 ± 0,44 | 1,64 ± 2,33 | 0,28 ± 0,04 | 0,58 ± 0,19 | 0,14 ± 0,03 | 0,06 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 |
| PV | 0,62 ± 0,09 | n.d. | 5,73 ± 0,76 | 0,42 ± 0,08 | n.d. | n.d. | 0,57 ± 0,10 | n.d. |
| SH | n.d. | 3,29 ± 0,49 | 0,56 ± 0,01 | 0,22 ± 0,08 | n.d. | 0,02 ± 0,01 | 0,16 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 |
| TA | 0,78 ± 0,16 | n.d. | 1,14 ± 0,56 | 0,23 ± 0,00 | n.d. | n.d. | 1,38 ± 0,22 | n.d. |
| TE | n.d. | 0,25 ± 0,35 | 0,47 ± 0,04 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,20 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| TN | 4,21 ± 5,96 | n.d. | 2,42 ± 3,23 | 0,64 ± 0,12 | n.d. | n.d. | 1,85 ± 2,58 | n.d. |
| VAR 4 | 0,53 ± 0,49 | 4,84 ± 0,42 | 1,64 ± 0,82 | 0,43 ± 0,07 | 0,24 ± 0,11 | 0,02 ± 0,03 | 0,44 ± 0,32 | 0,06 ± 0,05 |
| VAR 8 | n.d. | 2,34 ± 0,34 | 1,40 ± 0,17 | 0,13 ± 0,01 | 0,14 ± 0,06 | n.d. | 0,34 ± 0,34 | 0,09 ± 0,09 |
| VAR 30 | 44,20 ± 32,25 | n.d. | 17,60 ± 8,04 | 1,39 ± 0,18 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR 32 | n.d. | n.d. | 3,99 ± 1,21 | 0,88 ± 0,20 | n.d. | 0,09 ± 0,13 | 0,27 ± 0,38 | n.d. |
| VAR 33 | n.d. | n.d. | 1,28 ± 0,77 | 0,37 ± 0,09 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR 34 | 0,10 ± 0,14 | n.d. | 2,14 ± 0,98 | 0,11 ± 0,03 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| ZF | n.d. | n.d. | 0,48 ± 0,15 | 1,09 ± 0,08 | n.d. | n.d. | 0,05 ± 0,07 | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.12 (Cont.). Composición fenólica de los extractos acuosos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Cis-piceido | Trans-piceido | Quercetina 3-O-glucósido | Quercetina 3-O-galactósido | 2,3-Dihidroquercetina |
|-------------|--------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| AB | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| BE | n.d. | n.d. | 6,85 ± 1,67 | 5,51 ± 1,48 | n.d. |
| CA | n.d. | n.d. | 2,65 ± 3,75 | 6,55 ± 0,76 | n.d. |
| CF | n.d. | n.d. | 2,50 ± 3,54 | n.d. | n.d. |
| CI | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CS | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CT | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| GA | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| GN | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MN | n.d. | n.d. | 5,28 ± 0,38 | 3,68 ± 0,32 | n.d. |
| MT | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| NE | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PAN | 0,55 ± 0,78 | n.d. | 1,97 ± 2,79 | 3,51 ± 0,03 | n.d. |
| PN | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PV | n.d. | 0,43 ± 0,61 | 3,22 ± 4,56 | 5,07 ± 1,39 | 3,76 ± 5,32 |
| SH | n.d. | 0,06 ± 0,03 | 2,37 ± 3,35 | 3,39 ± 0,20 | n.d. |
| TA | 2,12 ± 0,59 | 0,40 ± 0,33 | n.d. | 6,02 ± 0,35 | n.d. |
| TE | 0,12 ± 0,01 | 0,28 ± 0,05 | 2,16 ± 3,05 | n.d. | n.d. |
| TN | 2,50 ± 1,15 | 1,94 ± 2,70 | 3,13 ± 4,43 | 3,31 ± 4,69 | n.d. |
| VAR 4 | 0,02 ± 0,00 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR 8 | 0,04 ± 0,06 | n.d. | n.d. | 3,78 ± 0,51 | n.d. |
| VAR 30 | n.d. | 0,61 ± 0,86 | 5,03 ± 0,47 | 4,12 ± 0,54 | n.d. |
| VAR 32 | n.d. | n.d. | 6,35 ± 0,57 | 4,96 ± 0,08 | 11,29 ± 6,36 |
| VAR 33 | 1,20 ± 1,69 | n.d. | 6,14 ± 1,76 | 4,21 ± 0,66 | 3,11 ± 4,40 |
| VAR 34 | n.d. | n.d. | 2,71 ± 3,83 | 4,39 ± 0,91 | n.d. |
| ZF | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.13. Composición fenólica de los extractos etanólicos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Cianidina 3-O-glucósido | Delfinidina 3-O-glucósido | Malvidina 3-O-glucósido | Peonidina 3-O-glucósido | Petunidina 3-O-glucósido |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| AB | 12,03 ± 1,86* | 10,11 ± 0,52 | 86,74 ± 1,51 | 197,23 ± 20,93 | 29,46 ± 1,24 |
| BE | 5,15 ± 0,21 | 5,89 ± 0,24 | 25,41 ± 2,20 | 11,19 ± 0,67 | 11,77 ± 0,49 |
| CA | n.d. | 2,76 ± 3,90 | 23,84 ± 1,37 | 10,34 ± 0,50 | 4,55 ± 6,43 |
| CF | 19,53 ± 3,84 | 14,74 ± 2,74 | 36,92 ± 4,19 | 57,62 ± 10,03 | 31,95 ± 5,34 |
| CI | 4,74 ± 0,18 | 4,93 ± 0,09 | 12,68 ± 1,37 | 10,74 ± 1,05 | 7,80 ± 0,24 |
| CS | 5,24 ± 0,17 | 6,15 ± 0,12 | 31,46 ± 2,40 | 13,03 ± 1,02 | 11,64 ± 0,28 |
| CT | 2,48 ± 3,50 | 5,60 ± 0,06 | 51,66 ± 19,65 | 16,60 ± 2,95 | 10,16 ± 1,50 |
| GA | 5,61 ± 0,24 | 5,72 ± 0,58 | 34,85 ± 4,47 | 22,21 ± 1,85 | 12,32 ± 2,58 |
| GN | 6,80 ± 0,52 | 5,91 ± 0,53 | 35,37 ± 8,36 | 39,78 ± 4,33 | 13,17 ± 2,38 |
| MN | 29,87 ± 6,70 | 10,81 ± 0,33 | 40,69 ± 6,12 | 64,50 ± 14,44 | 33,30 ± 2,65 |
| MT | 20,91 ± 0,92 | 16,07 ± 0,80 | 38,84 ± 4,03 | 51,53 ± 3,19 | 37,26 ± 3,14 |
| NE | 5,32 ± 0,60 | 5,64 ± 0,58 | 44,65 ± 12,68 | 10,00 ± 1,71 | 10,00 ± 1,71 |
| PAN | 4,77 ± 0,44 | 5,07 ± 0,54 | 24,20 ± 3,50 | 18,20 ± 1,96 | 9,96 ± 1,59 |
| PN | 7,33 ± 1,10 | 6,99 ± 0,40 | 38,34 ± 6,99 | 53,24 ± 20,72 | 13,29 ± 1,09 |
| PV | 6,02 ± 0,43 | 9,37 ± 0,17 | 40,35 ± 1,26 | 16,55 ± 0,07 | 23,35 ± 0,50 |
| SH | 14,22 ± 1,59 | 7,91 ± 0,39 | 37,36 ± 2,72 | 77,69 ± 5,72 | 18,59 ± 1,88 |
| TA | 7,45 ± 0,30 | 8,46 ± 1,24 | 56,56 ± 10,99 | 29,54 ± 3,25 | 25,68 ± 7,05 |
| TE | 11,15 ± 1,08 | 10,94 ± 1,27 | 37,36 ± 3,82 | 35,10 ± 8,06 | 27,71 ± 4,88 |
| TN | 9,37 ± 1,80 | 8,30 ± 1,49 | 47,09 ± 6,62 | 66,53 ± 12,89 | 21,57 ± 7,59 |
| VAR 4 | 10,28 ± 1,32 | 9,77 ± 0,30 | 60,82 ± 3,60 | 40,66 ± 6,02 | 31,04 ± 3,38 |
| VAR 8 | 7,67 ± 1,20 | 7,02 ± 0,24 | 32,47 ± 6,14 | 31,40 ± 9,12 | 16,41 ± 2,25 |
| VAR 30 | 7,78 ± 0,00 | 7,72 ± 0,15 | 30,33 ± 0,15 | 73,45 ± 0,13 | 19,28 ± 0,53 |
| VAR 32 | 12,17 ± 1,26 | 13,26 ± 1,23 | 67,82 ± 6,02 | 37,58 ± 2,56 | 46,53 ± 3,12 |
| VAR 33 | 5,85 ± 0,14 | 6,66 ± 0,30 | 34,68 ± 2,10 | 22,05 ± 1,39 | 15,02 ± 0,64 |
| VAR 34 | 6,17 ± 0,41 | 5,72 ± 0,16 | 33,31 ± 4,63 | 47,02 ± 1,84 | 12,04 ± 0,92 |
| ZF | 8,85 ± 1,21 | 7,11 ± 0,35 | 62,54 ± 0,77 | 52,61 ± 6,92 | 21,67 ± 0,34 |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.13 (Cont.). Composición fenólica de los extractos etanólicos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Catequina | Epicatequina | Gálico | Siringico | Vainillico | Ferúlico | Trans-cafeico | p-cumárico |
|--------|----------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| AB | 28,72 ± 17,72* | 34,46 ± 23,13 | 5,21 ± 0,91 | 0,57 ± 0,06 | 0,57 ± 0,30 | 2,61 ± 1,75 | 26,92 ± 7,83 | 7,28 ± 2,37 |
| BE | n.d. | 15,03 ± 2,18 | 5,30 ± 1,34 | 0,35 ± 0,04 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CA | 0,28 ± 0,00 | 1,54 ± 0,34 | 1,10 ± 0,12 | 1,27 ± 0,47 | 0,13 ± 0,01 | n.d. | 0,08 ± 0,01 | n.d. |
| CF | 4,34 ± 4,04 | 14,17 ± 10,91 | 2,19 ± 0,33 | 0,10 ± 0,02 | 0,21 ± 0,09 | 0,03 ± 0,04 | 0,42 ± 0,05 | n.d. |
| CI | 2,23 ± 1,20 | 31,15 ± 23,40 | 1,71 ± 0,86 | 0,25 ± 0,16 | 0,12 ± 0,10 | n.d. | n.d. | n.d. |
| CS | 15,02 ± 7,77 | 10,68 ± 6,82 | 2,62 ± 1,29 | 5,12 ± 0,46 | 0,16 ± 0,08 | 2,87 ± 0,06 | 1,50 ± 0,10 | 3,02 ± 0,89 |
| CT | n.d. | n.d. | 0,26 ± 0,00 | 4,76 ± 1,00 | n.d. | n.d. | 0,68 ± 0,02 | n.d. |
| GA | 0,03 ± 0,05 | 0,86 ± 0,12 | 0,79 ± 0,10 | 0,50 ± 0,22 | 0,21 ± 0,04 | n.d. | 0,15 ± 0,01 | n.d. |
| GN | 0,54 ± 0,19 | 4,68 ± 1,48 | 1,41 ± 0,10 | 1,00 ± 0,02 | 0,40 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 | n.d. | 0,00 ± 0,00 |
| MN | 7,49 ± 0,29 | 3,40 ± 0,04 | 3,28 ± 0,00 | 0,56 ± 0,04 | n.d. | 2,64 ± 1,00 | 0,15 ± 0,15 | 3,04 ± 3,17 |
| MT | 14,58 ± 18,10 | 32,00 ± 45,25 | 2,11 ± 2,27 | n.d. | 0,16 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,77 ± 0,06 | 0,01 ± 0,00 |
| NE | 1,13 ± 1,60 | 0,56 ± 0,80 | 1,35 ± 0,03 | 0,48 ± 0,13 | n.d. | 3,80 ± 5,38 | 0,47 ± 0,35 | 0,36 ± 0,51 |
| PAN | 7,94 ± 1,34 | 1,63 ± 0,21 | 0,22 ± 0,03 | n.d. | 0,03 ± 0,01 | 3,49 ± 1,11 | 0,51 ± 0,11 | 0,92 ± 0,30 |
| PN | 2,77 ± 2,98 | 5,04 ± 3,57 | 0,50 ± 0,13 | 1,41 ± 0,59 | 0,18 ± 0,26 | 0,00 ± 0,01 | 0,19 ± 0,09 | 0,02 ± 0,03 |
| PV | 3,56 ± 0,15 | 6,70 ± 0,13 | 1,55 ± 0,53 | n.d. | 0,11 ± 0,03 | 0,19 ± 0,18 | 0,70 ± 0,01 | 2,42 ± 0,46 |
| SH | 3,50 ± 0,68 | 19,85 ± 1,20 | 2,16 ± 0,02 | 0,57 ± 0,10 | 0,19 ± 0,01 | 0,13 ± 0,04 | 1,16 ± 0,02 | 0,08 ± 0,05 |
| TA | 1,44 ± 0,35 | 27,70 ± 8,53 | 1,33 ± 0,40 | 0,89 ± 0,03 | n.d. | n.d. | 0,12 ± 0,02 | n.d. |
| TE | 0,99 ± 1,04 | 1,32 ± 1,18 | 1,49 ± 0,51 | 0,38 ± 0,20 | 0,07 ± 0,09 | n.d. | 0,75 ± 0,16 | 0,02 ± 0,02 |
| TN | 4,41 ± 2,57 | 13,97 ± 10,76 | 1,40 ± 0,54 | 0,81 ± 0,17 | 0,07 ± 0,10 | n.d. | 0,23 ± 0,03 | n.d. |
| VAR 4 | 37,59 ± 19,43 | 37,05 ± 5,93 | 5,52 ± 0,66 | 0,67 ± 0,05 | 0,38 ± 0,10 | 0,18 ± 0,12 | 0,75 ± 0,28 | 0,09 ± 0,02 |
| VAR 8 | 0,49 ± 0,19 | 4,34 ± 0,21 | 1,86 ± 0,49 | 0,82 ± 0,37 | 0,25 ± 0,05 | 0,02 ± 0,03 | 0,38 ± 0,04 | 0,10 ± 0,04 |
| VAR 30 | 164,04 ± 46,90 | n.d. | 40,31 ± 9,48 | 2,85 ± 0,27 | n.d. | n.d. | 0,02 ± 0,03 | n.d. |
| VAR 32 | 10,43 ± 2,13 | n.d. | 4,36 ± 0,93 | 1,57 ± 0,03 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| VAR 33 | 2,94 ± 0,47 | 0,49 ± 0,06 | 0,27 ± 0,15 | n.d. | n.d. | 1,50 ± 0,61 | 0,12 ± 0,05 | 0,56 ± 0,01 |
| VAR 34 | 1,37 ± 1,93 | 1,32 ± 1,87 | 0,72 ± 0,80 | 0,27 ± 0,38 | n.d. | n.d. | 0,02 ± 0,03 | 0,04 ± 0,05 |
| ZF | 3,29 ± 1,07 | 37,69 ± 5,70 | 2,61 ± 0,78 | 0,90 ± 0,55 | 0,22 ± 0,09 | n.d. | n.d. | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado

Tabla A.13 (Cont.). Composición fenólica de los extractos etanólicos de variedades de uva tinta (mg/L extracto).

| VAR. | Cis-piceido | Trans-piceido | Cis-resveratrol | Quercetina 3-O-glucósido | Quercetina 3-O-galactósido | 2,3-Dihidroquercetina |
|--------|--------------|---------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| AB | 1,01 ± 0,29* | 0,58 ± 0,07 | n.d. | 7,75 ± 1,41 | 5,00 ± 0,38 | 20,68 ± 7,69 |
| BE | 0,54 ± 0,07 | n.d. | n.d. | 6,10 ± 0,21 | 3,06 ± 0,31 | n.d. |
| CA | 0,81 ± 0,07 | 0,05 ± 0,02 | n.d. | 7,20 ± 3,22 | 10,52 ± 0,08 | n.d. |
| CF | n.d. | n.d. | n.d. | 14,09 ± 4,05 | 5,03 ± 1,94 | n.d. |
| CI | 0,31 ± 0,06 | n.d. | n.d. | 3,94 ± 0,36 | 2,94 ± 0,62 | n.d. |
| CS | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 5,45 ± 0,48 | 0,95 ± 0,24 |
| CT | n.d. | n.d. | n.d. | 5,20 ± 0,63 | 5,71 ± 0,07 | n.d. |
| GA | n.d. | n.d. | n.d. | 5,60 ± 0,64 | 1,69 ± 2,40 | n.d. |
| GN | 0,34 ± 0,02 | n.d. | n.d. | 10,69 ± 3,46 | 12,42 ± 2,84 | n.d. |
| MN | 0,70 ± 0,56 | n.d. | 0,33 ± 0,46 | 18,60 ± 2,02 | 12,73 ± 2,84 | 20,19 ± 5,11 |
| MT | 0,04 ± 0,02 | n.d. | n.d. | 16,53 ± 4,13 | 6,97 ± 0,68 | n.d. |
| NE | n.d. | n.d. | n.d. | 10,93 ± 4,28 | 13,34 ± 9,03 | n.d. |
| PAN | 1,67 ± 0,47 | n.d. | 0,24 ± 0,34 | 4,77 ± 0,36 | 7,19 ± 0,50 | n.d. |
| PN | n.d. | 0,03 ± 0,04 | n.d. | 2,46 ± 3,48 | 3,73 ± 0,35 | n.d. |
| PV | 2,14 ± 0,22 | 0,10 ± 0,10 | 0,40 ± 0,04 | 6,87 ± 0,29 | 4,82 ± 0,21 | 11,17 ± 1,28 |
| SH | 0,12 ± 0,05 | 0,09 ± 0,01 | n.d. | 14,29 ± 3,78 | 4,01 ± 0,63 | n.d. |
| TA | 1,77 ± 0,33 | 2,69 ± 0,93 | n.d. | n.d. | 4,58 ± 0,35 | n.d. |
| TE | 0,07 ± 0,02 | n.d. | n.d. | 6,32 ± 0,97 | 5,05 ± 0,14 | n.d. |
| TN | 3,78 ± 0,97 | 6,49 ± 1,84 | n.d. | 4,91 ± 0,12 | 5,72 ± 1,26 | n.d. |
| VAR 4 | 0,29 ± 0,41 | 0,15 ± 0,21 | n.d. | 12,27 ± 9,06 | 9,57 ± 4,97 | n.d. |
| VAR 8 | 0,56 ± 0,20 | 0,04 ± 0,06 | n.d. | 9,44 ± 5,69 | 4,58 ± 1,77 | n.d. |
| VAR 30 | n.d. | 0,66 ± 0,56 | 0,17 ± 0,24 | 4,27 ± 0,23 | 4,26 ± 0,17 | n.d. |
| VAR 32 | n.d. | 1,29 ± 1,82 | n.d. | 6,39 ± 1,81 | 7,07 ± 2,66 | 29,18 ± 15,57 |
| VAR 33 | n.d. | n.d. | n.d. | 13,43 ± 0,54 | 4,19 ± 0,08 | 16,59 ± 3,42 |
| VAR 34 | n.d. | 0,76 ± 1,07 | 0,52 ± 0,21 | 15,18 ± 6,91 | 8,55 ± 2,68 | 3,26 ± 1,11 |
| ZF | 0,18 ± 0,20 | 0,06 ± 0,08 | n.d. | n.d. | 3,84 ± 0,23 | n.d. |

*Media ± SD; n.d.= no detectado.

Tabla A.14. Suma de compuestos fenólicos de los extractos acuosos y etanólicos de variedades de uva blanca (mg/L extracto).

| VAR. | Acuoso (mg/L) | Etanólico (mg/L) |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|
| AB | 138,97 ± 81,57 ^{*ab} | 474,34 ± 87,47 ^a |
| BE | 84,38 ± 8,32 ^{bc} | 89,79 ± 0,12 ⁱ |
| CA | 70,75 ± 9,18 ^{cd} | 64,47 ± 6,17 ^j |
| CF | 74,23 ± 16,55 ^{cd} | 201,31 ± 47,56 ^{cde} |
| CI | 23,01 ± 4,36 ^f | 83,55 ± 29,70 ^{hi} |
| CS | 49,39 ± 2,57 ^{def} | 112,05 ± 13,45 ^{gh} |
| CT | 33,04 ± 3,85 ^f | 103,13 ± 29,35 ^{gh} |
| GA | 0,51 ± 0,23 ^g | 90,56 ± 6,68 ^h |
| GN | 39,19 ± 13,35 ^{ef} | 132,52 ± 1,41 ^{fg} |
| MN | 95,75 ± 9,61 ^{abc} | 249,64 ± 17,40 ^{cd} |
| MT | 55,14 ± 7,17 ^{cdef} | 237,76 ± 80,94 ^{cd} |
| NE | 32,67 ± 1,47 ^{ef} | 104,21 ± 27,43 ^{gh} |
| PAN | 52,40 ± 1,95 ^{cdef} | 87,32 ± 10,75 ^{hi} |
| PN | 46,88 ± 5,60 ^{cdef} | 135,52 ± 26,72 ^{fg} |
| PV | 99,44 ± 19,15 ^{abc} | 136,17 ± 2,15 ^{fg} |
| SH | 78,75 ± 6,16 ^{bcd} | 201,78 ± 8,39 ^d |
| TA | 93,40 ± 8,94 ^{abc} | 168,21 ± 32,30 ^{ef} |
| TE | 69,61 ± 1,11 ^{cde} | 138,70 ± 23,14 ^{fg} |
| TN | 99,04 ± 62,44 ^{abc} | 194,66 ± 46,48 ^{cde} |
| VAR 4 | 47,80 ± 6,67 ^{def} | 256,88 ± 55,70 ^c |
| VAR 8 | 74,00 ± 8,36 ^{cde} | 117,82 ± 26,43 ^{gh} |
| VAR 30 | 154,12 ± 48,90 ^a | 355,13 ± 56,17 ^c |
| VAR 32 | 107,56 ± 51,34 ^{abc} | 237,65 ± 32,96 ^{cd} |
| VAR 33 | 74,28 ± 23,45 ^{cde} | 122,84 ± 9,04 ^{fgh} |
| VAR 34 | 69,72 ± 9,89 ^{cde} | 136,26 ± 10,64 ^{fg} |
| ZF | 58,11 ± 17,23 ^{def} | 201,57 ± 16,56 ^{de} |

*Media ± SD; n.d.= no detecta

^{a,b,c} Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).